



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DOS GENES *CTLA4*, *NOS3* E *CYP* EM
PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO
HEMORRÁGICO (AVEH) E/OU ANEURISMA INTRACEREBRAL EM UMA
AMOSTRA DO DISTRITO FEDERAL.

LIGIA CANONGIA DE ABREU CARDOSO

Brasília – DF
Fevereiro/2017

LIGIA CANONGIA DE ABREU CARDOSO

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DOS GENES *CTLA4*, *NOS3* E *CYP* EM
PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO
HEMORRÁGICO (AVEH) E/OU ANEURISMA INTRACEREBRAL EM UMA
AMOSTRA DO DISTRITO FEDERAL.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ildinete Silva Pereira

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Brasília – DF
Fevereiro/2017

À minha família por acreditar em mim e sempre me apoiar com muito carinho, aos meus pais que não mediram esforços para que eu concluísse mais uma etapa na minha vida, ao meu noivo que esteve ao meu lado em todos os momentos.

Agradecimentos

A Deus por me dar força e coragem para superar desafios.

À Universidade de Brasília - UnB e seu corpo docente por me proporcionar imenso aprendizado na Pós-Graduação.

À minha orientadora Profa. Dra. Ildinete Silva Pereira, pelo carinho, orientação e suporte em todos os momentos.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva, por todo empenho, dedicação, orientação, paciência e, principalmente, pela amizade durante os anos de mestrado.

Ao Prof. Dr. Luzitano Brandão Ferreira, pelas oportunidades que me foram oferecidas para que fosse possível a realização do mestrado.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Haddad, pelo apoio durante as práticas laboratoriais e em congressos.

Às técnicas de laboratório Lorena e Nara, pela amizade, suporte e atenção durante os dias de pesquisa.

Aos membros do Laboratório de Patologia Molecular, pelo apoio acadêmico.

Aos colegas de Laboratório que me incentivaram e ajudaram durante as pesquisas.

À minha amiga Renata Souza, que desde o primeiro dia esteve ao meu lado tanto na bancada quanto no dia-a-dia.

À minha amiga Renata Andrade, pela ajuda e direção nas práticas laboratoriais, na montagem de cronograma, na programação das aulas e que sempre esteve presente em todos os momentos.

Ao meu amigo Felipe Borges, que me auxiliou durante as práticas de extração de DNA apoiando e motivando a conclusão do projeto.

À minha amiga Thaís Souza, pelo aprendizado das técnicas laboratoriais.

Ao CNPq, FAPDF e Faculdade LS pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional

À minha família, noivo e amigos pela contribuição valiosa durante minha pós-graduação.

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo. Devemos promover coragem onde há medo, promover o acordo onde existe conflito e inspirar a esperança onde há desespero. ”

Nelson Mandela.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Acidente Vascular Encefálico	2
1.2 Fisiopatologia	4
1.3 Classificação Etiológica	6
1.3.1 Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico (AVEH)	6
1.3.2 Acidente Vascular Encefálico Isquêmico (AVEI)	7
1.3.3 Aneurisma Intracerebral	8
1.4 Escalas de consciência	9
1.5 Epidemiologia	11
1.6 Fatores de Risco	14
2. Polimorfismos genéticos	16
2.1 <i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA4)</i>	18
2.2 Óxido Nítrico Sintase Endotelial (NOS3)	19
2.3 Citocromo p450 2D6 (CYP2D6)	20
3. Objetivos	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivos Específicos	22
4. METODOLOGIA	23
4.1 Delineamento	23
4.2 Campo de estudo	23
4.3 Amostra	24
4.4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	25
4.5 Termo de Guarda de Material Biológico	25
4.6 Procedimentos Técnicos e Laboratoriais	26
4.6.1 Extração de DNA	26
4.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	26
4.6.3 RFLP – <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> / Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de restrição	29
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5.1 Estimativa das frequências genotípicas e de dados dos participantes da pesquisa.	34

6. RESULTADOS	35
6.1 Caracterização dos grupos de estudo	35
6.2 Resultados da avaliação do polimorfismo genético <i>CTLA4</i> -318 C/T	40
6.3 Resultados da avaliação do polimorfismo genético <i>NOS3</i> íntron 4.....	50
6.4 Resultados da avaliação do polimorfismo genético <i>NOS3</i> -786 T/C.....	58
6.5 Resultados da avaliação do polimorfismo genético <i>CYP2D6</i> 1846 G/A.....	66
7. DISCUSSÃO	74
8. CONCLUSÃO	85
9. REFERÊNCIAS	88
ANEXOS	99

Lista de Abreviaturas

A1C - Hemoglobina Glicada
AHA/ASA - *American Heart Association/American Stroke Association*
AIT - Ataque Isquêmico Transitório
APCs – Células Apresentadoras de Antígenos
ATP - Adenosina Trifosfato
AVE - Acidente Vascular Encefálico
AVEH - Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico
AVEI - Acidente Vascular Encefálico Isquêmico
CEO - Carcinoma Epidermóide Oral
CTLA4 - Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
CYP - Citocromo p450
CYP2D6 - Citocromo p450 2D6
DAC - Doença Arterial Coronariana
DATASUS - Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DCBV - Doenças Cerebrovasculares
DM - Diabetes Mellitus DIC - Doenças Isquêmicas do Coração
ERM - Escala de Rankin Modificada
HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica
HAVEI - Hospitalização por AVEI
IAM - Infarto Agudo do Miocárdio
IC - Insuficiência Cardíaca
ICH - Hemorragia intracerebral espontânea IMC - Índice de Massa Corporal
IR - Insuficiência Renal
NIHSS - *Nation Institutes of Health Stroke Scale*
NO - Óxido Nítrico
NOS - NO sintases
NOS3 - Óxido Nítrico Sintase Endotelial
OMS - Organização Mundial da Saúde
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PIC - Pressão Intracraniana
RFLP - Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de restrição
RNAm - RNA mensageiro

SNC - Sistema Nervoso Central

SNPs - Polimorfismos de Nucleotídeo Único

STR - Short Tandem Repeats

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

VNTRs - *Variable Number Tandem Repeat*

Resumo

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) corresponde a uma disfunção neurológica aguda causada pela interrupção do fluxo sanguíneo em áreas do encéfalo, ocasionando diversas incapacidades e o acometimento global interfere em atividades diárias da vida do paciente. O Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico (AVEH), compreende a hemorragia subaracnóide e a hemorragia intraparenquimatosa, que tem como principal doença associada a hipertensão arterial sistêmica (HAS). No Brasil, são registradas mais de 68 mil mortes por AVE anualmente, tal doença representa a primeira causa de morte e incapacidade no país, gerando impacto social e econômico. Neste trabalho foram avaliados Polimorfismos Genéticos em pacientes diagnosticados com AVEH e/ou Aneurisma Intracerebral. Polimorfismo genético pode ser compreendido quando há mutação de nucleotídeos em pelo menos 1% dos indivíduos da espécie, onde um específico gene apresenta variações em suas sequências codificadora, não-codificadora ou promotoras, o que pode acarretar fenótipos diferentes. O objetivo do presente estudo foi investigar possível associação entre os polimorfismos dos genes *CTLA4*, *NOS3* e *CYP* e a ocorrência do AVEH e/ou Aneurisma Intracerebral, descrevendo frequências alélicas e genótípicas, avaliando diferentes manifestações clínicas e prognósticos de pacientes residentes no Distrito Federal. Os participantes preencheram uma ficha de identificação e foram sujeitos à coleta de sangue venoso. Após a coleta, foi realizada extração do DNA, PCR-RFLP e análise do genótipo. As frequências genótípicas foram estimadas por contagem direta, por meio do programa SPSS versão 23.0. Para comparação das distribuições das frequências foi aplicado o teste do qui-quadrado, de forma a detectar possíveis associações dos genótipos entre os grupos caso e controle. Foram consideradas associações com probabilidades menores que 5% ($P < 0,05$). Concluiu-se que independente do polimorfismo a presença da HAS é um fator de risco para a ocorrência de AVEH/Aneurisma e quando analisado o polimorfismo *CTLA4* -318 C/T, a presença do genótipo CT, foi considerada um fator de risco para a ocorrência de AVEH/Aneurisma. Os demais polimorfismos não obtiveram diferença estatística quanto à associação entre os diferentes genótipos.

Palavras-chave: Acidente Vascular Encefálico, Polimorfismo, *CTLA4*, *NOS3*, *CYP*.

Abstract

Stroke refers to an acute neurological dysfunction caused by disruption of blood flow in areas of the brain, causing various disabilities, and global impairment interferes with daily activities of the patient's life. Hemorrhagic Stroke (HS), includes subarachnoid hemorrhage and intraparenchymal hemorrhage, which has as its main disease associated with systemic arterial hypertension (SAH). In Brazil, more than 68 thousand deaths per year are registered, this disease represents the first cause of death and disability in the country, generating social and economic impact. Genetic polymorphism can be understood when there is a mutation of nucleotides in at least 1% of the individuals of the species, where a specific gene presents variations in its coding, non-coding or promoter sequences, which can lead to different phenotypes. The aim of the present study was to investigate possible association between the *CTLA4*, *NOS3* and *CYP* gene polymorphisms and the occurrence of hemorrhagic stroke/intracerebral aneurysm, describing allelic and genotype frequencies, evaluating different clinical manifestations and prognoses of patients residing in the Federal District. Participants filled out an identification form and were subjected to venous blood collection. After the collection, DNA extraction, PCR-RFLP and genotype analysis were performed. The genotypic frequencies were estimated by direct counting, using SPSS software version 23.0. To compare the frequency distributions, the chi-square test was applied in order to detect possible associations of genotypes between the case and control groups. Associations with probabilities less than 5% ($P < 0.05$) were considered. It was concluded that regardless of the polymorphism the presence of SAH is a risk factor for the occurrence of hemorrhagic stroke/Aneurysm. Analyzing the *CTLA4* -318 C/T polymorphism, the presence of the CT genotype was considered a risk factor for the occurrence of hemorrhagic stroke/Aneurysm. The other polymorphisms did not present statistical difference regarding the association between the different genotypes.

Key words: Stroke, Polymorphism, *CTLA4*, *NOS3*, *CYP*.

1. INTRODUÇÃO

Doenças Crônicas não transmissíveis são as principais causas de morte no mundo, representam 63% dos óbitos no mundo ocorridos em 2008, dentre elas, destacam-se as doenças isquêmicas do coração (DIC) e doenças cerebrovasculares (DCBV), dentro do grupo de DCBV, o Acidente Vascular Encefálico (AVE) tornou-se uma das principais causas de incapacidade, sendo considerada a segunda doença com maior taxa de mortalidade (Ferreira and Ferreira 2012, Malta, Oliveira et al. 2016)

De acordo com o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), no Brasil 28,2% dos óbitos em 2012 foram resultados de doenças do aparelho circulatório, sendo que desses óbitos 30,1% foram por DCBV e 13,6% por doenças hipertensivas, tais óbitos são prevalentes na região Nordeste e possuem uma redução nas regiões Sudeste e Sul quando comparadas às regiões Norte e Centro-Oeste. (de Padua Mansur and Favarato 2016, Villela, Klein et al. 2016).

O AVE corresponde a uma disfunção neurológica aguda causada pela interrupção do fluxo sanguíneo em áreas do encéfalo, ocasionando diversas incapacidades e o acometimento global interfere em atividades diárias da vida do paciente (Medeiros, Fernandes et al. 2014).

Após a ocorrência do AVE, um dos maiores riscos é o AVE secundário, também conhecido como AVE recorrente, que ocorre nas primeiras 24 horas ou mais após o primeiro AVE e pode envolver qualquer área vascular do encéfalo. O AVE secundário está associado a um aumento de mortalidade e a um pior prognóstico quando comparado ao primeiro AVE. A morbidade causada pelo AVE é considerada a maior causa de incapacidade no mundo (Peter and Justus 2016).

Pacientes acometidos pelo AVE apresentam variados graus de dependência para a realização de suas atividades diárias, portanto, cabe ao profissional, em seu trabalho interdisciplinar atentar para todas necessidades do paciente e atuar com vistas à integralidade de suas ações. É importante destacar propostas de promoção de saúde e ações preventivas, além do trabalho centrado no conhecimento biomédico (Araujo, Ximenes et al. 2013).

1.1 Acidente Vascular Encefálico

O AVE é considerado um déficit neurológico (transitório ou definitivo) em uma área do encéfalo que ocorre secundário a uma lesão vascular. Pode ser dividido em duas categorias principais: isquêmicos (87%) e hemorrágicos (13%). Tais categorias apresentam semelhanças, porém diferem quanto à etiologia, fisiopatologia, tratamento médico e cirúrgico (Montaner, Mendioroz et al. 2012).

O Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico (AVEH), compreende a hemorragia subaracnóide e a hemorragia intraparenquimatosa, que tem como principal doença associada a hipertensão arterial sistêmica (HAS); e o Acidente Vascular Encefálico Isquêmico (AVEI) define um déficit neurológico devido a insuficiência de suprimento sanguíneo no encéfalo, podendo ser temporário ou permanente, tem como principais fatores de risco a HAS, diabetes mellitus e cardiopatias (Radanovic 2000).

A *American Heart Association* desenvolveu um conceito de saúde cardiovascular ideal para ser aplicado em todo o mundo, que é definido com a presença simultânea de quatro comportamentos de saúde ideais: ser não-fumante, obter Índice de Massa Corporal (IMC) $<25 \text{ kg/m}^2$, realizar atividades físicas regularmente e seguir uma dieta consistente; e com três fatores de saúde ideais: obter índice de colesterol total $< 200 \text{ mg/dL}$, pressão arterial sistólica $< 120 \text{ mmHg}$ e diastólica $< 80 \text{ mmHg}$, e glicose em jejum $< 100 \text{ mg/dL}$. Tais medidas buscam a prevenção de fatores de risco para a ocorrência de doenças cardiovasculares e AVE (Zhang, Zhou et al. 2013).

Taylor, Trialists e colaboradores afirmam que o AVE não é mais considerado uma doença sem tratamento e com morbidade a longo prazo. Hospitais públicos e privados da África do Sul ganharam bastante atenção devido à sua desenvoltura multidisciplinar em tratamento de pacientes com AVE. Nas unidades de AVE, os cuidados dos pacientes ficam sob a supervisão de uma equipe multidisciplinar especializada na gestão da doença (Trialists' Collaboration 2013, Taylor, le Feuvre et al. 2016).

Cerca de 60 a 70% dos casos de AVE ocorrem em pessoas com mais de 65 anos e esses pacientes acometidos pelo AVE tornam-se cada vez mais dependentes, com a necessidade de apoio permanente, o que produz impacto na qualidade de vida do acometido. Devido à dependência física surgem alterações sociais como o

isolamento, alterações econômicas e emocionais, podem ocorrer transtornos neuropsiquiátricos como a depressão (Marques and Martins 2012, Silva, Neves et al. 2016).

Diversas terapias têm sido estudadas na tentativa de minimizar as sequelas do AVE, entre as quais estão a redução do equilíbrio e da mobilidade funcional. Estudos vêm propondo medidas que proporcionem melhora no quadro do paciente e em sua qualidade de vida. Bacha e colaboradores (2016) afirmam que o treinamento funcional tem se sobressaído com opção de tratamento para idosos, pois possui características para manutenção da mobilidade funcional e independência dos acometidos.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu como qualidade de vida “a percepção do indivíduo da sua posição na vida, no contexto da cultura e sistema de valores nos quais ele vive, e em relação aos seus objetivos, expectativas, padrões e preocupações”. As experiências clínicas e mudanças comportamentais dos pacientes devem ser avaliadas para que seja mantida a qualidade de vida, devido a isso são realizadas avaliações de qualidade de vida a partir de escalas (Fleck, Louzada et al. 2000, Suzano, de Almeida et al. 2016).

1.2 Fisiopatologia

O encéfalo exige um suprimento constante de oxigênio e glicose que são fornecidos pela circulação sanguínea. O fluxo sanguíneo cerebral é cerca de 50mL por minuto para cada 100g de tecido e se mantém constante devido às pressões sanguíneas e intracranianas que se mantêm contínuas pela auto regulação da resistência vascular (Pereira 2013).

Tal auto regulação ainda não é completamente compreendida, porém, sabe-se que mecanismos neurogênicos e o óxido nítrico (NO) são participantes deste processo. Mediadores químicos liberados pelo NO podem controlar a reatividade vascular e inibir o acúmulo de plaquetas e leucócitos. Experimentos demonstraram que camundongos deficientes da enzima óxido nítrico sintase endotelial (NOS3) possuíam um maior volume do enfarte cerebral. Essas e outras observações sugerem que o NO no endotélio pode proteger o tecido encefálico isquêmico por mecanismos hemodinâmicos (del Zoppo and Hallenbeck 2000).

A fisiopatologia do AVEH depende da etiologia e do tipo de distúrbio vascular. Os sintomas como deterioração ou perda da função neurológica são produzidos quando há um rápido acúmulo de sangue dentro do parênquima cerebral, devido à hemorragia, que leva à ruptura da artéria e aumento da pressão no local (Fann, Lee et al. 2013).

O metabolismo normal do encéfalo é rompido pelo fato de ter sido exposto ao sangue, que geram efeitos patológicos como alterações devido à citotoxicidade do sangue, hipermetabolismo, stress oxidativo e inflamação. Ocorre uma isquemia secundária no encéfalo devido à pressão de perfusão reduzida (Aronowski and Zhao 2011).

Estudos correlacionam os níveis de pressão arterial sistólica e diastólica com o risco de ocorrência de doenças cardiovasculares e AVE. Quanto ao AVE, diferentes etiologias têm sido associadas com os níveis de pressão arterial e que ambos os valores altos ou baixos estão associados a um mau prognóstico para deterioração neurológica precoce (Zis, Vemmos et al. 2013).

O Aumento da pressão intracraniana (PIC) devido ao derramamento de sangue no encéfalo pode levar à disfunção vascular cerebral e congestão vascular com posterior edema cerebral. Como o aumento da PIC sobe para níveis que se aproximam da pressão arterial média, a pressão de perfusão cerebral se aproxima de

zero, o que resulta na perda de fluxo sanguíneo. Este processo pode conduzir à isquemia encefálica quando o fluxo sanguíneo não cumprir as exigências metabólicas dos tecidos (Donnelly 2014).

A isquemia encefálica desencadeia alterações no metabolismo de neurônios e células da glia, podendo levar à morte celular pela falência de seu metabolismo e por falta de suprimento energético. Durante a isquemia, há uma diminuição do nível de adenosina trifosfato (ATP) disponível, levando à disfunção da bomba de sódio e potássio, acúmulo do sódio intracelular e como consequência alteração do potencial de membrana e edema celular (Homi, Júnior et al. 2000)

Aneurismas intracranianos ocorrem em decorrência da dilatação das paredes da artéria cerebral que se desenvolve em devido a fraqueza da parede arterial, são mais comuns na bifurcação da artéria carótida interna e cerebral média, sendo 72,5% dos casos nestas localizações. Podem apresentar-se de diversas formas sendo a mais frequente a ruptura do aneurisma gerando uma hemorragia subaracnóide (Wanderley Filho, Junior et al. 2013).

O processo inflamatório desempenha um papel importante na patogênese do aneurisma intracerebral. O dano oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio pode danificar as paredes dos vasos por conta da geração de radicais livres, através do recrutamento de células pró-inflamatórias. Aneurismas intracerebrais desenvolvem pontos de ramificação de vasos ao longo das artérias que são áreas de alto estresse hemodinâmico (Starke, Chalouhi et al. 2014).

1.3 Classificação Etiológica

1.3.1 Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico (AVEH)

O AVEH é uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo sendo responsável por 10-15% de todos os casos de AVE (Mota, Meireles et al. 2016).

Envolve a ruptura de uma artéria intracerebral e por consequente um derramamento de sangue, formando um hematoma. Alguns danos cerebrais envolvem a morte de células que foram privadas de oxigênio e nutrientes, inicia-se então um processo degenerativo que elimina progressivamente neurônios e astrócitos da região do AVEH dentro de 24 horas. Células vizinhas também podem ser perdidas dentro de semanas subsequentes. A fase secundária envolve uma resposta inflamatória do tecido encefálico que causa edema, constrição de vasos, citotoxicidade e acidose (Robinson, Dang et al. 2013).

O AVEH é uma doença multifatorial resultante da combinação de fatores e genéticos e ambientais. Fatores de risco contribuem para o aumento do risco na ocorrência do AVEH (Silva 2013, Hopewell and Clarke 2016).

É considerado mais debilitante e grave quando comparado ao AVEI sendo que 34% dos casos resultam em óbito dentro de 30 dias. Casos de hemorragias intracerebrais e hemorragias subaracnóides podem decorrer da ruptura de um aneurisma intracraniano. (Robinson, Dang et al. 2013).

A hemorragia intracerebral primária ocorre devido à ruptura espontânea causada pela hipertensão descontrolada, é uma das formas mais letais do AVEH. Contudo, a localização e o volume do hematoma são fortes preditores para se definir um bom prognóstico. A expansão do hematoma acontece em 30% dos pacientes, o que significa apenas piora do quadro, porém pode ser evitada. A hemorragia intracerebral secundária está associada a malformações arteriovenosas, aneurismas intracranianos e medicamentos (Brouwers, Chang et al. 2014).

A hemorragia subaracnóide é considerada um caos de urgência médica com altas taxas de morbidade e mortalidade. Avanços no tratamento têm gerado uma queda quanto a taxa de mortalidade, e a porcentagem de sobreviventes após a ruptura do aneurisma pode ser de até 65%. Déficits na construção visual, memória, flexibilidade mental, deficiência cognitiva e velocidade psicomotora são demonstrados

mesmo em pacientes com bom prognóstico e podem persistir por mais de um ano (da Costa, Dunkley et al. 2016).

González-Pérez e colaboradores (2013) em um estudo coorte realizado no Reino Unido, examinaram a letalidade de curto e longo prazo de pacientes que sofreram hemorragia intracerebral primária e hemorragia subaracnóide entre os anos 2000 e 2008. Tal estudo demonstrou que pacientes com menos de 50 anos são mais propensos a morrer depois da hemorragia intracerebral primária em comparação com a hemorragia subaracnóide. Além disso, os sobreviventes de ambos casos continuam a ter risco de morte em comparação com uma população de referência.

1.3.2 Acidente Vascular Encefálico Isquêmico (AVEI)

O encéfalo pode ser privado de oxigênio de duas formas, entrando em hipóxia funcional quando há baixa pressão parcial de oxigênio, devido a incapacidade de carreamento de oxigênio pelo sangue ou quando ocorre a isquemia, podendo esta ser transitória ou permanente, devido a interrupção do fluxo sanguíneo por perfusão reduzida ou obstrução de um vaso (Loterio 2015).

Ao se avaliar medidas específicas para o controle do AVEI, é necessário que o conceito de zona de penumbra isquêmica seja esclarecido. Esta é uma área ao redor do núcleo isquêmico, caracterizada por isquemia moderada, disfunção celular, porém não há morte celular, tal área é reversível após a reperfusão (Rolindo and Oliveira 2016).

A isquemia produz uma série de alterações moleculares e celulares, como disfunção inflamatória molecular e desequilíbrio de íons que levam a um estado patológico grave. Durante a reperfusão, após a isquemia, a restauração de oxigênio e fornecimento de glicose restabelecem a fosforilação oxidativa que ajuda a normalizar os níveis de energia exigidos nos processos fisiológicos (Burcu, Osman et al. 2016).

Menos que 5% dos pacientes acometidos por AVEI recebem terapia trombolítica intravenosa, este fato se dá pelo receio dos médicos de piorar a evolução dos pacientes com AVEI ou pela admissão tardia do paciente no hospital. Contudo, essa terapia trombolítica venosa dentro de uma janela de tempo de 4 horas e 30 minutos após a ocorrência do AVEI pode oferecer efeito benéfico em pacientes selecionados (Strbian, Engelter et al. 2012, Sundseth, Faiz et al. 2014).

Indivíduos pós-AVEI podem enfrentar incapacidades como paralisia dos músculos, rigidez em partes do corpo, perda de mobilidade das articulações, dores difusas, problemas de memória, dificuldade na comunicação oral e incapacidades sensoriais. A funcionalidade do indivíduo é um fator importante associado a independência e qualidade de vida. Porém a restrição no funcionamento físico e cognitivo tende a piorar a saúde mental do acometido pelo AVEI (Estrela-Dias and Pais-Ribeiro 2014).

1.3.3 Aneurisma Intracerebral

Aneurismas Intracerebrais são lesões comumente adquiridas e encontradas em 1 a 6% das autópsias *post mortem*. O aneurisma sacular ou congênito é o tipo mais comum de aneurisma intracerebral, cerca de 90% dos aneurismas saculares ocorrem na circulação anterior próximo aos pontos de ramificação arterial. Os Aneurismas Intracerebrais caracterizam-se por uma dilatação localizada e anormal na parede das artérias, situadas geralmente no polígono arterial de Willis (Pinto and Zago 2000).

Na maioria dos casos os aneurismas não se rompem e passam por toda a vida do indivíduo sem diagnóstico. Contudo 27 mil novos casos de hemorragia subaracnóide nos Estados Unidos são decorrentes de aneurismas, sendo que destes 5 a 15% evoluem para um AVEH (Magistris, Bazak et al. 2013).

Os fatores mais importantes para o surgimento do aneurisma intracerebral são a vulnerabilidade da parede arterial e o aumento do estresse hemodinâmico. Estudos histopatológicos em aneurismas demonstram a falta da lâmina elástica interna com as camadas íntima, média e adventícia normais associada à presença de polimorfonucleares, linfócitos e células plasmáticas (LOURENÇO, JÚNIOR et al. 2013).

O diagnóstico do aneurisma intracerebral pode ser realizado através de tomografia computadorizada do crânio; angiotomografia, útil em aneurismas clipados e pacientes submetidos a técnicas endovasculares; angiorressonância magnética, possibilita a reconstrução de vasos, porém com uso restrito em aneurismas clipados e angiografia cerebral por cateterização intra-arterial, sendo padrão ouro para o diagnóstico de aneurisma intracerebral (Fukujima and Gabbai 2001).

1.4 Escalas de consciência

O atendimento ao paciente que sofrera o AVE requer muita atenção e depende de uma equipe multidisciplinar bem capacitada para o desenvolvimento de protocolos. É de fundamental importância que a equipe de socorro imediato faça a avaliação neurológica do paciente, observando o nível de consciência aplicando algumas escalas (ALBAN and CARVALHO 2016).

Tais escalas examinam a presença de incapacidades relacionadas ao AVE e fornecem informações para um prognóstico funcional, sendo fundamentais como guias em programas de reabilitação funcional, assim como, adaptação a atividades diárias (Pawlowski, de Carvalho Rodrigues et al. 2013).

A escala de coma de Glasgow tornou-se uma importante ferramenta para a investigação de lesões cerebrais traumáticas desde a sua introdução em meio acadêmico por Teasdale e Jennett, quando se notou ser vital a capacidade de avaliar e registrar mudanças em estados de consciência alterada de forma confiável, assim como a inconsistência de sistemas para descrever pacientes com alterações de consciência que muitas vezes descreviam em termos de má compreensão (Barker, Whyte et al. 2014).

Em 1974, Teasdale e Jennett afirmam que se deve avaliar três aspectos diferentes da resposta comportamental: resposta motora, resposta verbal e abertura dos olhos, sendo cada uma avaliada independentemente da outra, o que depende de respostas que podem ser claramente definidas e graduadas de acordo com a ordem de classificação que indica o grau de disfunção (Teasdale and Jennett 1974).

O desenvolvimento da escala de coma de Glasgow começou em 1971, como um instrumento para melhorar o atendimento clínico de pacientes com lesão cerebral aguda e como consequência seus prognósticos. A pesquisa que produziu a escala ocorreu na unidade de neurocirurgia do Instituto de Ciências Neurológicas, em Glasgow, Reino Unido, uma clínica multidisciplinar que prestava serviços no oeste da Escócia (Teasdale, Maas et al. 2014).

Completando 40 anos, a escala de coma de Glasgow é utilizada clinicamente em todo o mundo, e seu artigo pioneiro de 1974 em 2010 foi considerado um dos artigos de neurocirurgia mais citados em todo o mundo, contudo, há a preocupação de que com o passar do tempo, sua divulgação foi acompanhada com alterações na técnica de aplicação, há relatos de diferentes técnicas e avaliação de fatores como

confusão e intubação, além disso há alterações na forma como os resultados são tratados (Ponce and Lozano 2010, Reith, Brennan et al. 2016).

A escala de Rankin é uma escala bem estabelecida para avaliar pacientes acometidos por AVE, contudo, possui uma confiabilidade abaixo do ideal e para limitar subjetividades foi proposto um questionário simplificado para a Escala de Rankin Modificada, o qual apresenta boa confiabilidade e um tempo médio de conclusão de 1,5 minutos (Bruno, Close et al. 2013).

Tal escala é considerada uma escala ordinal com pontuação definida por 7 graus classificados da seguinte forma: 0, assintomático; 1, nenhuma deficiência significativa e apesar dos sintomas é capaz de desempenhar todas as tarefas e atividades habituais; 2, ligeira deficiência, não é possível executar todas as atividades anteriores, mas capaz de cuidar de seus assuntos sem ajuda; 3, deficiência moderada, exige alguma ajuda, mas capaz de andar sem ajuda; 4, deficiência moderada a grave, é incapaz de andar sem ajuda e incapaz de atender às próprias necessidades corporais sem assistência; 5, incapacidade grave, acamado, incontinente e exigindo cuidados de enfermagem e atenção constantes; e 6, a morte (Cheng, Forkert et al. 2014).

Pesquisadores de AVE estudam medidas globais para avaliar pacientes acometidos e então desenvolver um bom prognóstico quanto à deficiência de cada paciente. As escalas para o AVE são mundialmente conhecidas, confiáveis e validadas, sendo importantes na prática clínica, uma vez que a mensuração acurada do estado funcional do paciente é de grande relevância (de Brito, Lins et al. 2013).

O Índice de Barthel compreende a avaliação de dez itens que consideram a independência funcional em pacientes acometidos por AVE. O escore varia de 0 a 100, onde é considerado: dependência severa, escores inferiores a 45; dependência grave, entre 45 e 59; dependência moderada entre 60 e 80 e dependência leve, entre 81 e 100 (Rangel, Belasco et al. 2013).

1.5 Epidemiologia

A OMS relata que o AVEH possui 15 milhões de casos em todo o mundo a cada ano, destes, mais de cinco milhões morrem e outros cinco milhões permanecem incapacitados. A maioria destas mortes ocorre geralmente em países desenvolvidos (Somarajan, Kalita et al. 2011, Kumar, Sagar et al. 2013, Tada, Shiffman et al. 2014).

A cada ano mais de 690.000 norte-americanos sofrem um AVEI, esta enorme morbidade é resultante de um comprometimento neurológico, emocional e social. Apesar do aumento do número de casos de AVEH em todo o mundo, avanços vem sendo relatados quanto ao controle de novos casos (Kernan, Ovbiagele et al. 2014).

Em 2008, após anos sendo a terceira principal causa de morte nos Estados Unidos, o AVE caiu para a quarta principal causa de morte. O que reflete o compromisso e o trabalho realizado pela *American Heart Association/American Stroke Association* (AHA/ASA), a razão do sucesso quanto à redução de óbitos foi considerada multifatorial e incluiu uma melhor prevenção e melhores cuidados nas primeiras horas da ocorrência do AVE (Jauch, Saver et al. 2013).

A incidência do AVE na China tem aumentado rapidamente ao longo dos anos. Cerca de 15 milhões de morte estão associadas ao AVE por ano, e já se torna a primeira causa de mortalidade na China, tal taxa está intimamente associada com a idade, significativamente mais presente em pacientes idosos. Devido ao envelhecimento demográfico na China, torna-se urgente compreender a tendência do prognóstico do AVE (He, Wu et al. 2014).

O AVEH e as doenças cardíacas são as principais doenças acometidas no mundo, embora o AVE seja mais evidente em países em desenvolvimento, por exemplo, as taxas de mortalidade por doenças cardíacas são ligeiramente mais elevadas na América do Norte, Europa e Austrália. Em contraste as taxas de mortalidade por AVE são mais elevadas em grande parte da África e Ásia (Figura 1) (Kim and Johnston 2013).

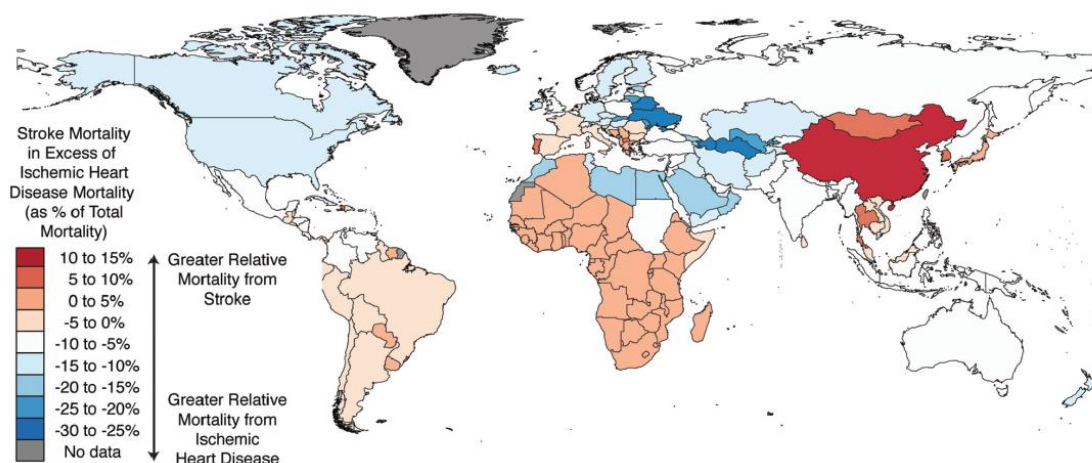


Figura 1: taxa de mortalidade relativa de AVE em comparação com doença isquêmica do coração. 2004. (OMS – Organização Mundial da Saúde) Fonte: (Kim and Johnston 2013)

No Brasil, são registradas mais de 68 mil mortes por AVE anualmente, tal doença representa a primeira causa de morte e incapacidade no país, gerando impacto social e econômico. A OMS recomenda adoção de medidas de emergência para a prevenção e tratamento da doença, uma vez que 90% dos casos podem ser prevenidos. O Ministério da Saúde afirma que o fumo é responsável por 25% das doenças vasculares, entre elas o AVE (Portal Saúde. 2016).

O AVE em 2005 ocasionou cerca de 5,7 milhões de mortes. Estudos revelam uma elevada taxa de mortalidade por AVE no Brasil ao final da década de 1980. A redução de óbitos por AVE iniciou em meados da década de 1960 e foi estabilizada ao final do século XX em países como Estados Unidos, Canadá e Austrália. O Brasil apresenta redução da taxa de mortalidade por AVE semelhante à dos países em desenvolvimento, porém ainda é a quarta maior taxa de toda América Latina (Garritano, Luz et al. 2012).

Há evidências do declínio da taxa de mortalidade por AVE no estado de São Paulo desde 1870 e em todo o país desde 1980. De 1979 a 1996, a taxa de mortalidade ajustada por idade em adultos brasileiros com 30 anos ou mais diminuiu de 200 para 164 mortes por 100.000 habitantes homens e de 168 para 130 mortes por 100.000 mulheres (Passos, Ishitani et al. 2016).

Estudos brasileiros nos estados de São Paulo e Santa Catarina demonstraram uma taxa de mortalidade reduzida em 20%, semelhante ao observado em países desenvolvidos. Na população da cidade de Joinville, SC, observou-se uma diminuição de 30% na mortalidade em casos de AVE (Minelli, Fen et al. 2007, Cabral, Gonçalves et al. 2009).

No sul do Brasil, Copstein e colaboradores (2013) afirmam que há uma alta prevalência de sobreviventes de AVE em uma população vulnerável na cidade de Porto Alegre. Foram identificados como fatores de risco para a ocorrência de AVE idade, tabagismo, hipertensão e doença coronariana. Maior escolaridade foi associada como um fator de proteção contra o AVE. Contudo os autores informam que há necessidade de implementação de políticas públicas de baixo custo para melhoramento do número de sobreviventes.

Em sobreviventes de AVE com mais de 65 anos são comumente relatadas dificuldades após 6 meses da lesão, tais como, hemiparesia, incapacidade de andar sem assistência, alterações cognitivas, sintomas de depressão, afasia e dependência para serem realizadas as atividades diárias (Caro, Mendes et al. 2016).

Com a implementação do Programa Nacional de Assistência aos Portadores de Hipertensão Arterial Sistêmica, denominado HIPERDIA em 2002, foi permitido evidenciar uma redução acentuada nas taxas de hospitalização por AVEI (HAVEI). Lopes e colaboradores (2016) afirmam que houve um declínio acentuado na incidência de HAVEI no Brasil em todas faixas etárias e sexo, contudo não evidencia a diminuição da mortalidade por AVEI, por esta ser dependente de melhorias no sistema de saúde, incluindo suporte de urgência e emergência.

1.6 Fatores de Risco

A ocorrência do AVE na maioria dos casos é secundária à presença de fatores de risco em cada paciente. Tais fatores de risco podem ser divididos em modificáveis e não modificáveis. Existem fatores de risco cardiovasculares que podem ser tratáveis, porém aumentam o risco de desenvolver o AVE (Rodrigues, Castro et al. 2013).

Fatores de risco para AVE modificáveis incluem: Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), Diabetes Mellitus (DM), tabagismo, etilismo e glicemia. Os fatores de risco não modificáveis são os que não podem ser tratados como alterações congênitas, idade, sexo e etnia (Rodrigues, da Silva et al. 2016).

A HAS é o fator de risco para AVE mais importante e melhor documentado. Estudos afirmam que avaliando a pressão arterial em 115/75 mmHg, alterações de 20 mmHg na sistólica e 10 mmHg na diastólica para cima estão associadas a um aumento de risco de 2 vezes para mortalidade por AVE. Globalmente a HAS está presente em um a cada três adultos, condição que faz com que 51% das mortes dos portadores de HAS seja por AVE. (Hong, Bang et al. 2013, Owolabi and Agunloye 2013).

A DM é uma doença metabólica, cuja principal clínica é a hiperglicemia. As principais formas clínicas de DM são o tipo 1 e o 2. A DM tipo 1 decorre da destruição imunológica das células- β pancreáticas (células de Langerhans) e é responsável por aproximadamente 10% dos casos, tais pacientes passam a depender da insulina para sobrevivência e tendem a descompensar com cetoacidose (Oselka and Troster 2000).

A DM tipo 2 é a forma mais prevalente, correspondendo a mais de 90% dos casos, e está basicamente associada a dois mecanismos: disfunção de células- β e resistência à ação da insulina, que varia da resistência à insulina predominante com deficiência relativa de insulina aos casos em que predomina o defeito secretório com resistência à insulina. Esta última, por sua vez, está intimamente relacionada a obesidade e ao sedentarismo (Oselka and Troster 2000, Bosi, Carvalho et al. 2009).

Pacientes com DM possuem um aumento de risco para ocorrência do AVE e nota-se que este risco ocorre de 10 a 15 anos mais cedo do que em indivíduos não diabéticos. Além disso a síndrome metabólica e seus componentes também demonstram um aumento de risco para a ocorrência do AVE, especialmente em

pacientes com DM tipo 2. Vários estudos avaliam a DM tipo 2 como fator de risco, porém são poucos os que estudam a DM tipo 1 (Hägg, Thorn et al. 2014).

Khoury e colaboradores (2013) afirmam que a população com DM é substancialmente um fator de risco para a ocorrência de AVE. Seus dados destacam a crescente prevalência de DM em paciente com AVE ao longo do tempo, além disso demonstram uma taxa de incidência 3 a 4 vezes de AVEI em paciente com DM.

Foi demonstrado que o tabagismo é um fator de risco para ambos os tipos de AVE, isquêmico e hemorrágico, tanto em homem quanto em mulheres. Fumantes possuem uma duplicação quanto ao risco de ocorrência do AVE durante suas vidas em comparação aos que nunca fumaram. Estimativas indicam que 19% das causas de AVE são em decorrência do fumo (Peters, Huxley et al. 2013).

Segundo a OMS o etilismo mata cerca de 2,5 milhões de pessoas por ano, causando 4% de todas as mortes. O uso prejudicial do álcool é fator de risco, principalmente entre os homens com idades entre 15 e 59 anos, para a ocorrência não somente de AVE mas como cirrose, convulsões, acidentes, violência e câncer (O'Keefe, Bhatti et al. 2014).

Eventos pós-prandiais são reconhecidos como fatores de risco para doenças vasculares. Valores elevados de glicemia pós-prandial são marcadores do aumento de resistência da insulina que quando associados a outros fatores como síndrome metabólica e pressão arterial elevada formam um fator de risco para a ocorrência do AVE (Mirrahimi, Chiavaroli et al. 2014)

O AVE é conhecido por ter um efeito maior em mulheres do que em homens, embora quando se trata de idade a incidência aumenta em homens e os piores prognósticos aumentam em mulheres, pois a incidência do AVE é maior em grupos etários mais velhos e as mulheres possuem maior longevidade. Em todo o mundo, a incidência do AVE é 33% mais elevado em homens do que em mulheres fato também observado na prevalência, sendo 41% maior em homens (Wang, Ning et al. 2014).

Há cada vez mais evidências sobre as diferenças na incidência do AVE, principalmente quando relacionadas à grupos étnicos. Na Inglaterra e País de Gales as variações na ocorrência do AVE são grandes, onde negros são mais acometidos pelo AVE, quase que duas vezes mais do que outros grupos étnicos da população. Nas populações de Bangladesh e Paquistão a prevalência de AVE é mais que o dobro em homens (Bhopal, Bansal et al. 2012).

Além dos fatores de risco originalmente estudados, a identificação de fatores de risco não tradicionais para o AVE vêm aumentando. Alguns fatores como obesidade, síndrome metabólica, apnéia do sono, inflamação crônica, doença renal crônica, nutrição, anticoncepcionais orais, estresse, depressão e poluição do ar têm sido avaliados com novos fatores de disparo para a ocorrência do AVE (Silva, Nascimento et al. 2013, Bang, Ovbiagele et al. 2015).

2. Polimorfismos genéticos

O projeto genoma humano consistiu em um esforço internacional para o mapeamento do genoma humano, tal projeto surgiu a partir de duas ideias chave no início de 1980, a de que a capacidade de analisar pontos de vista globais aceleraria a pesquisa biomédica analisando problemas de forma abrangente e imparcial e a construção de um ponto de vista global que exigiria esforço de toda comunidade científica (Lander, Linton et al. 2001).

O estabelecimento da tecnologia de sequenciamento do DNA por Walter Gilbert e Allan Maxam gerou um número de sequências de DNA disponíveis em bancos de dados de genômica que têm crescido exponencialmente nos últimos anos, o que conta com o auxílio de novas gerações de sequenciadores de alta eficiência (Carrer, Barbosa et al. 2010).

Polimorfismo genético pode ser compreendido quando há mutação de nucleotídeos em pelo menos 1% dos indivíduos da espécie, onde um específico gene apresenta variações em suas sequências codificadoras, não-codificadoras ou promotoras, o que pode acarretar fenótipos diferentes. (Salazar Pelaéz, Fernández Grisales et al. 2012).

SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) constituem 90% das variações encontradas no genoma humano e podem ocorrer em um a cada 1.000 pares de bases, sendo comuns no genoma humano e podendo ser responsáveis por diversas patologias. SNPs nas regiões promotoras e codantes possuem maior probabilidade de modificar o desempenho do gene e por consequência a tradução em proteína (de Marqui 2015).

O número de identificação de referência de um SNP, ou ID "rs", é uma etiqueta de identificação atribuída pelo NCBI a um grupo de SNPs que mapeiam para uma localização idêntica. O número "rs" é um identificador exclusivo para SNP e não deduz a posição, podendo ter uma ou mais posições numa sequência. Sendo que tais identificações para os polimorfismos deste estudo são: *CTLA4* -318 C/T (rs5742909), *NOS3* -786 T/C (rs2070744) e *CYP2D6* (rs3892097) (Bhagwat 2010).

Os polimorfismos de comprimento de sequência única englobam VNTRs (variable number tandem repeat) ou minissatélites e STR (short tandem repeats) ou microssatélites. Os VNTRs possuem repetições in tandem de 10 a 64 pares de base, enquanto os STRs possuem repetições de 2 a 9 pares de base. STRs e SNPS são comumente utilizados na identificação humana, tendo amplas análises em casos forenses (da Silva Leite, Batista et al. 2013).

VNTRs são marcadores informativos para caracterização genética e são denominados como codominantes na natureza. A utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em VNTRs tem sido útil em diagnósticos pré-natais, quantificação de quimerismo pós transplante, análise de doenças e diversos estudos de população (Pellerin, McKercher et al. 2016, Sajib, Yeasmin et al. 2016).

Polimorfismos genéticos podem configurar uma genética de risco ou proteção quando uma proteína codificada por um gene polimórfico participa de processos biológicos, porém nem todo polimorfismo tem significado funcional. A presença de alelos polimórficos em uma população não afetada reflete que tais polimorfismos não são determinantes e outros fatores devem ser investigados (Teles 2013).

Estudos de variação genética sugerem que do total de casos de AVE aproximadamente 38% são hereditários, também afirmam que a maior parte da contribuição genética para o AVE é poligênica e reflete efeitos de múltiplos genes cada um exercendo pequenos efeitos (Hopewell and Clarke 2016).

2.1 Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA4)

O *CTLA4* é uma potente molécula imunorreguladora que desempenha um papel na regulação negativa de ativação e proliferação de células T. O *CTLA4* pode induzir a apoptose independente de células T ativadas, o que inibe a função imune de linfócitos T (Zhao, Duan et al. 2014).

Moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, expressas na superfície de Células Apresentadoras de Antígenos (APCs), possuem como papel principal a indução de resposta imune e manutenção da tolerância. Tais moléculas quando se ligam ao receptor CD28, presente em linfócitos T, promovem o segundo sinal necessário para ativação e proliferação de linfócitos T, contudo, quando se ligam ao receptor *CTLA4* inibem a resposta celular (Migliori 2010).

O CD80 e CD86 presentes na célula apresentadora de antígeno se ligam ao *CTLA4* com mais força do que o CD28. Tal descoberta levou à proposta de que o *CTLA4* atua em competição com o CD28, bloqueando sua sinalização e atenuando a resposta de células T ao antígeno, retardando o aparecimento de doenças. (Rudd 2008).

Wang e colaboradores (2015) afirmam que o polimorfismo do gene *CTLA4* está associado com a diminuição do risco de ocorrência de câncer, especialmente câncer de mama e de pulmão. Reconhecendo que o *CTLA4* atua como um regulador negativo na ativação de células T reduzindo a produção de receptores das interleucinas 1 e 2, responsáveis pela diferenciação e proliferação de linfócitos, e retardando as células T na fase G1 do ciclo celular, induzindo assim a apoptose da célula.

O polimorfismo do gene *CTLA4* -318 C/T (rs5742909) já foi descrito por desempenhar um papel na regulação da autotolerância do sistema imune. A presença do alelo T pode regular positivamente a expressão do *CTLA4* e já foi relatado em doenças autoimunes como a artrite reumatoide (Lee, Bae et al. 2015).

Lozano e colaboradores (2011) inferem que indivíduos portadores do alelo T no SNP -318 possuem maior expressão de *CTLA4* na superfície celular. Tal SNP foi associado com uma maior atividade promotora, o que aumenta a expressão do gene e condiz com forte efeito regulador do *CTLA4* em linfócitos T.

Wang e colaboradores Wang, Jiang et al. (2009) afirmaram que a apresentação do antígeno pode estar envolvida no desencadeamento do AVE idiopático em crianças e que moléculas envolvidas na co-estimulação da ativação das células T, como o

CTLA4, podem ser importantes na regulação da apresentação do antígeno no AVE idiopático. É por isso que utilizamos o gene *CTLA4* como candidato para determinar se o polimorfismo de tal molécula co-estimuladora de células T está associada ao AVEH.

O gene *CTLA4* está localizado no cromossomo 2q33 e é composto por 4 éxons que possuem funções distintas como: domínio extracelular, transmembrânico e citoplasmático, e 3 íntrons (Liu and Zhang 2013).

2.2 Óxido Nítrico Sintase Endotelial (NOS3)

O óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir da L-arginina que é transformada em um intermediário, a N-hidroxi-L-arginina, com a presença de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) e Ca^{2+} e após é necessário mais NADPH e O_2 para a formação de L-citrulina e NO. Muitas células são capazes de sintetizar NO através de enzimas NO sintases (NOS), tais sintases possuem três isoenzimas. A isoforma I está presente no cérebro, isoforma II é induzida por macrófagos e outras células e a isoforma III (NOS3) é expressa por células endoteliais (Flora Filho and Zilberstein 2000).

O NO possui várias atividades fisiológicas que incluem a regulação do fluxo sanguíneo cerebral e a modulação das atividades neuronais. Qualquer defeito na NOS3 induz à disfunção endotelial vascular e diminuição das atividades cerebrais. Doenças como aterosclerose e o AVE estão relacionadas à disfunção da NOS3 (Elneam, Boghdady et al. 2015).

O gene *NOS3* está localizado no cromossomo 7q35-36, contém 26 éxons e 21 kb de DNA. Os polimorfismos 4b/a localizado no íntron 4 e o -786 T/C na região promotora têm sido amplamente investigados. Estudos têm demonstrado que tais polimorfismos estão associados à ocorrência de AVEI. Os polimorfismos íntron 4 e -786 T/C estão associados com o AVEI em populações asiáticas, além disso o íntron 4 pode estar também relacionado com a ocorrência de AVE em populações brancas (Niu, Yang et al. 2013).

O SNP do gene *NOS3* -786 T/C (rs2070744), foi estudado por alterar a expressão do *NOS3* e reduzir a atividade promotora do gene, a desregulação de *NOS3* influencia no nível de NO plasmático, que possui propriedades antitrombóticas e anti-inflamatórias (Liu, Geng et al. 2014).

O VNTR localizado no íntron 4 do *NOS3* está intimamente associado com a concentração de NO no plasma. Tal polimorfismo possui uma sequência de 27 pares de base, onde há um alelo maior e outro menor. O alelo maior “b” possui 5 repetições *in tandem* de 27 pares de base, enquanto o alelo menor “a” possui 4 repetições (Türkanoğlu Özçelik, Can Demirdöğen et al. 2014).

Zhao e colaboradores (2012) sugeriram em uma meta-análise que o VNTR no íntron 4 possui efeito protetores significativos contra retinopatia diabética, principalmente em pacientes diagnosticados com diabetes tipo 2. Contudo a presença do alelo C do SNP -786 T/C pode ser considerado um fator de proteção para tal patologia.

2.3 Citocromo p450 2D6 (*CYP2D6*)

O gene citocromo p450 (CYP) 2D6 é membro da subfamília de genes CYP2D. Embora a enzima CYP2D6 seja mais extensivamente estudada devido a sua importância clínica, a evolução da subfamília CYP2D ainda não foi completamente compreendida. As enzimas CYP catalisam a oxidação de substratos exógenos e endógenos como medicamentos, químicos ambientais, ácidos graxos e esteróides. Tais enzimas são proteínas ligadas a membrana celular expressas em eucariotos e procariotos. (Yasukochi and Satta 2015).

As enzimas CYP desempenham um papel importante na biotransformação de fármacos, mediando até 90% do metabolismo de oxidação do fármaco. O gene *CYP2D6* está entre os principais que desempenham tal papel, metabolizando aproximadamente 19% do fármaco. A variabilidade de *CYP* é atribuída a fatores genéticos que podem ser indicadores para terapias individualizadas. A relação entre uma específica enzima CYP e seu polimorfismo tem sido amplamente estudada (Wu, Zhang et al. 2013).

A CYP2D6 tem recebido bastante atenção desde o início de 1970, devido a sua grande variação individual que levou à descoberta de deleção e duplicação no gene *CYP2D6*. O gene possui 9 éxons e 8 íntrons que codificam um polipeptídeo de 497 aminoácidos. CYP2D6 constitui apenas 2 a 4% das enzimas hepáticas, porém possui um papel no metabolismo de fármacos maior que outras enzimas. (Ota, Hayashida et al. 2014).

A nomenclatura de CYP450 é determinada por convenção. CYP2D6*4, se refere à citocromo p450, família 2, subfamília D, isoenzima 6, variante alélica número 4. O alelo*4 possui frequência de 22% dos suecos, representando 75% dos alelos mutados (Gamarra 2011).

CYPs são encontradas no retículo endoplasmático ou em frações mitocondriais. O locus do gene *CYP2D6* é altamente polimórfico com mais de 80 variantes alélicas. *CYP2D6* localiza-se no cromossomo 22q13.1 (Zalata, El-Samanoudy et al. 2015).

Nepomnyashchikh e colaboradores (2012), investigando a cirrose hepática, estudou a associação de substituição de um nucleotídeo único na região 1846 G/A do gene *CYP2D6* (rs3892097), formando o agrupamento de alelos *CYP2D6**4, em Caucasianos com cirrose viral ou tóxica desenvolvida.

Por serem polimórficos, os genes que codificam as CYP levam à variação na atividade enzimática e por sua vez a suscetibilidade ao câncer. As enzimas codificadas pelos genes das *CYP2E1*, *CYP1A1* e *CYP1A2* estão envolvidas na ativação de diversas substâncias cancerígenas. O polimorfismo *CYP2D6**4 G/A resulta em uma capacidade limitada para metabolizar substâncias, tal diminuição prolonga o tempo de exposição a neurotoxinas, podendo levar a ocorrência de AVE. (de Leon, Armstrong et al. 2006)

Dentre os polimorfismos já descritos, o gene *CYP1A1* exibe uma substituição de C para T denominada 3801 C/T (*CYP1A1**2) no éxon 7, que cria um sítio de restrição para *MspI* e resulta em um aumento de três vezes na atividade enzimática, diferente do polimorfismo *CYP2D6**4 (Zordoky and El-Kadi 2010).

O efeito modificador dos polimorfismos sobre a atividade das enzimas CYP é o fator mais importante das diferenças individuais no metabolismo oxidativo das drogas. Conhecer o tipo do polimorfismo dado permite escolher o fármaco mais adequado e definir a dose eficaz exata (Nyíró, Inczédy-Farkas et al. 2012).

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Investigar possível associação entre os polimorfismos dos genes *CTLA4*, *NOS3* e *CYP* e a ocorrência do AVEH e/ou aneurisma intracerebral.

3.2 Objetivos Específicos

- Descrever as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos *CTLA4* -318 C/T, *NOS3* -786 T/C, *NOS3* íntron4 e *CYP2D6* 1846 G/A nos participantes do estudo
- Avaliar as diferentes manifestações clínicas e o prognósticos dos participantes da pesquisa com AVEH e/ou aneurisma intracerebral;
- Analisar a associação dos polimorfismos *CTLA4* -318 C/T, *NOS3* -786 T/C, *NOS3* intron4 e *CYP2D6* 1846 G/A e a ocorrência do AVEH e/ou aneurisma intracerebral residentes no Distrito Federal (Brasil);
- Analisar a associação entre os polimorfismos *CTLA4* -318 C/T, *NOS3* -786 T/C, *NOS3* intron4 e *CYP2D6* 1846 G/A com manifestações clínicas e o prognósticos de e/ou aneurisma intracerebral.

9. REFERÊNCIAS

- Agúndez, J. A., et al. (1996). "Genetic analysis of the NAT2 and CYP2D6 polymorphisms in white patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus." Pharmacogenetics and Genomics **6**(5): 465-472.
- ALBAN, F. S. and Y. L. d. CARVALHO (2016). "Aplicação das escalas de escore de trauma por equipes do atendimento pré-hospitalar."
- Ali, A. A., et al. (2013). "Genetic polymorphism of CYP2D6 gene among Egyptian hypertensive cases." The Journal of Basic & Applied Zoology **66**(4): 228-233.
- Anjos, S. M., et al. (2004). "Association of the cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 gene with type 1 diabetes: evidence for independent effects of two polymorphisms on the same haplotype block." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **89**(12): 6257-6265.
- Araujo, T. L. d., et al. (2013). "Competências essenciais de programas de assistência domiciliar para pacientes com acidente vascular cerebral."
- Aronowski, J. and X. Zhao (2011). "Molecular pathophysiology of cerebral hemorrhage secondary brain injury." Stroke **42**(6): 1781-1786.
- Association, A. D. (2014). "Standards of medical care in diabetes--2014." Diabetes care **37**: S14.
- Bacha, J. M. R., et al. (2016). "Impacto do treinamento sensório-motor com plataforma vibratória no equilíbrio e na mobilidade funcional de um indivíduo idoso com sequela de acidente vascular encefálico: relato de caso." Fisioterapia e Pesquisa **23**(1): 111-116.
- Bang, O. Y., et al. (2015). "Nontraditional Risk Factors for Ischemic Stroke An Update." Stroke **46**(12): 3571-3578.
- Barker, M. D., et al. (2014). "Application and clinical utility of the Glasgow coma scale over time: a study employing the NIDRR traumatic brain injury model systems database." The Journal of head trauma rehabilitation **29**(5): 400-406.
- Benjafield, A. V. and B. J. Morris (2000). "Association analyses of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in essential hypertension." American journal of hypertension **13**(9): 994-998.
- Bhagwat, M. (2010). "Searching NCBI's dbSNP database." Current Protocols in Bioinformatics: 1.19. 11-11.19. 18.
- Bharti, V., et al. (2013). "Functional genetic variants of CTLA-4 and risk of tobacco-related oral carcinoma in high-risk North Indian population." Human immunology **74**(3): 348-352.
- Bhopal, R., et al. (2012). "Ethnic variations in the incidence and mortality of stroke in the Scottish Health and Ethnicity Linkage Study of 4.65 million people." European journal of preventive cardiology **19**(6): 1503-1508.
- Bosi, P. L., et al. (2009). "Prevalência de diabetes melito e tolerância à glicose diminuída na população urbana de 30 a 79 anos da cidade de São Carlos, São Paulo." Arq Bras Endocrinol Metab **53**(6): 726-732.

Braga, G. P. (2016). "Alterações eletrocardiográficas como preditores de gravidade no acidente vascular cerebral."

Brouwers, H. B., et al. (2014). "Predicting hematoma expansion after primary intracerebral hemorrhage." JAMA neurology **71**(2): 158-164.

Bruno, A., et al. (2013). "Simplified modified Rankin Scale questionnaire correlates with stroke severity." Clinical rehabilitation: 0269215512470674.

Burcu, G. B., et al. (2016). "The protective cardiac effects of B-myrcene after global cerebral ischemia/reperfusion in C57BL/J6 mouse." Acta Cirurgica Brasileira **31**(7): 456-462.

Cabral, N. L., et al. (2009). "Trends in stroke incidence, mortality and case fatality rates in Joinville, Brazil: 1995–2006." Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry **80**(7): 749-754.

Caro, C. C., et al. (2016). "Independence and cognition post-stroke and its relationship to burden and quality of life of family caregivers." Topics in Stroke Rehabilitation: 1-6.

Carrer, H., et al. (2010). "Biotecnologia na agricultura." estudos avançados **24**(70): 149-164.

Cheng, B., et al. (2014). "Influence of stroke infarct location on functional outcome measured by the modified rankin scale." Stroke **45**(6): 1695-1702.

Copstein, L., et al. (2013). "Prevalence and risk factors for stroke in a population of Southern Brazil." Arquivos de neuro-psiquiatria **71**(5): 294-300.

da Costa, L., et al. (2016). "Increased Frontal Lobe Activation After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." Stroke: STROKEAHA. 116.013786.

da Silva Leite, V., et al. (2013). "Uso das técnicas de biologia molecular na genética forense." Derecho y Cambio Social **10**(34): 21.

Dardiotis, E., et al. (2010). "Genetic association studies in patients with traumatic brain injury." Neurosurgical focus **28**(1): E9.

de Brito, R. G., et al. (2013). "Instrumentos de avaliação funcional específicos para o acidente vascular cerebral."

de Leon, J., et al. (2006). "Clinical guidelines for psychiatrists for the use of pharmacogenetic testing for CYP450 2D6 and CYP450 2C19." Psychosomatics **47**(1): 75-85.

de Marqui, A. B. T. (2015). "Síndrome de Turner e polimorfismo genético: uma revisão sistemática." Revista Paulista de Pediatria **33**(3): 364-371.

de Padua Mansur, A. and D. Favarato (2016). "Mortalidade por Doenças Cardiovasculares em Mulheres e Homens nas cinco Regiões do Brasil, 1980-2012." Arq Bras Cardiol **107**(2): 137-146.

del Zoppo, G. J. and J. M. Hallenbeck (2000). "Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke." Thrombosis research **98**(3): 73-81.

Derebecka, N., et al. (2002). "Polymorphism in intron 23 of the endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) is not associated with hypertension." ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION- **49**(1): 263-268.

do Carmo, J. F., et al. (2016). "Incapacidade funcional e fatores associados em idosos após o Acidente Vascular Cerebral em Vitória–ES, Brasil." Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia **19**(5): 809-818.

Donnelly, M. K. (2014). Role of cytochrome p450 fatty acid metabolism in the pathophysiology of subarachnoid hemorrhage, University of Pittsburgh.

Elneam, A. I. A., et al. (2015). "Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism (T-786C) and Cerebrovascular Stroke with or without Smoking." International Journal **3**(6): 619-624.

Estrela-Dias, M. and J. L. Pais-Ribeiro (2014). "Intervenção psicológica positiva em grupo: forças e virtudes na reabilitação pós-AVC= Positive psychological group intervention: strengths and virtues in rehabilitation after stroke."

Fann, D. Y.-W., et al. (2013). "Pathogenesis of acute stroke and the role of inflammasomes." Ageing research reviews **12**(4): 941-966.

Fatini, C., et al. (2006). "Hemorheologic profile in systemic sclerosis: role of NOS3– 786T> C and 894G> T polymorphisms in modulating both the hemorheologic parameters and the susceptibility to the disease." Arthritis & Rheumatism **54**(7): 2263-2270.

Ferreira, A. I. d. S. and G. Ferreira (2012). "Prevalência de mortalidade por doenças cardiovasculares em uma cidade do sul de Minas Gerais nos anos de 1999 a 2008/Prevalence of cardiovascular mortality in a southern city of Minas Gerais in the years 1999 to 2008." REVISTA CIÊNCIAS EM SAÚDE **2**(2): 57-66.

Ferreira, D. V., et al. (2016). "A ATUAÃ± Æfo DO NUTRICIONISTA CLÃ NICO NA PREVENÃ± Æfo DOS FATORES DE RISCO AO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÃ LICO (AVE)." Revista Rede de Cuidados em Saúde **9**(3).

Ferreira, L. B. and M. G. Rola (2008). "Polimorfismos genéticos associados à hipertensão arterial sistêmica-doi: 10.5102/ucs.v6i1.464." Universitas: Ciências da Saúde **6**(1): 57-68.

Fleck, M. P., et al. (2000). "Aplicação da versão em português do instrumento abreviado de avaliação da qualidade de vida" WHOQOL-bref". Revista de saúde pública **34**(2): 178-183.

Flora Filho, R. and B. Zilberstein (2000). "Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções." Revista da Associação Médica Brasileira **46**(3): 265-271.

Fukujima, M. M. and A. A. Gabbai (2001). "Recomendações nos Casos de Aneurisma Cerebral Não Roto." Rev. Neurociências **9**(1): 32-35.

Furmann, N. and F. M. Costa (2015). "Critérios clínicos utilizados por profissionais para liberação de dieta via oral em pacientes adultos hospitalizados." Rev. CEFAC **17**(4): 1278-1287.

Galanakis, E., et al. (2008). "Intron 4 a/b polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with both type 1 and type 2 diabetes in a genetically homogeneous population." Human immunology **69**(4): 279-283.

Gamarra, J. G. A. (2011). Genotípica, Estudo para a caracterização genotípica e fenotípica da atividade enzimativa da subfamília citocromo p450 CYP2D6 de voluntários sadios Universidade de São Paulo.

Gamberini, M., et al. (2006). "Associação do polimorfismo+ 49 A/G no exon 1 do gene CTLA-4 com diabetes melito tipo 1 e suas apresentações clínicas." Arq Bras Endocrinol Metab **50**: S180.

Garritano, C. R., et al. (2012). "Análise da tendência da mortalidade por acidente vascular cerebral no Brasil no século XXI." Arq Bras Cardiol **98**(6): 519-527.

Glueck, C. J., et al. (2015). "The eNOS T786C mutation, Prinzmetal's Variant Angina, and amelioration of angina by l-arginine in 59 patients with intractable angina despite calcium channel blocker–nitrate therapy." IJC Metabolic & Endocrine **8**: 13-19.

González-Pérez, A., et al. (2013). "Mortality after hemorrhagic stroke Data from general practice (The Health Improvement Network)." Neurology **81**(6): 559-565.

Gu, L., et al. (2013). "The role of TNF- α 308G> A polymorphism in the risk for ischemic stroke." The American journal of the medical sciences **345**(3): 227-233.

Hägg, S., et al. (2014). "Different risk factor profiles for ischemic and hemorrhagic stroke in type 1 diabetes mellitus." Stroke **45**(9): 2558-2562.

He, Q., et al. (2014). "Trends in in-hospital mortality among patients with stroke in China." PloS one **9**(3): e92763.

Homi, H. M., et al. (2000). "Fisiopatologia da isquemia cerebral." Rev. bras. anestesiol **50**(5): 405-414.

Hong, K.-S., et al. (2013). "Stroke statistics in Korea: part I. Epidemiology and risk factors: a report from the korean stroke society and clinical research center for stroke." Journal of stroke **15**(1): 2-20.

Hopewell, J. C. and R. Clarke (2016). "Emerging Risk Factors for Stroke What Have We Learned From Mendelian Randomization Studies?" Stroke **47**(6): 1673-1678.

Jauch, E. C., et al. (2013). "Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association." Stroke **44**(3): 870-947.

Kallel, A., et al. (2013). "Polymorphisms of the NOS3 gene and risk of myocardial infarction in the Tunisian population." Cytokine **64**(3): 646-651.

Kernan, W. N., et al. (2014). "Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association." Stroke **45**(7): 2160-2236.

Khoury, J. C., et al. (2013). "Diabetes Mellitus A risk factor for ischemic stroke in a large biracial population." Stroke **44**(6): 1500-1504.

Kim, A. S. and S. C. Johnston (2013). "Temporal and geographic trends in the global stroke epidemic." Stroke **44**(6 suppl 1): S123-S125.

- Kokubo, Y., et al. (2006). "Association of sixty-one non-synonymous polymorphisms in forty-one hypertension candidate genes with blood pressure variation and hypertension." Hypertension research **29**(8): 611.
- Kumar, A., et al. (2013). "Identification of genetic contribution to ischemic stroke by screening of single nucleotide polymorphisms in stroke patients by using a case control study design." BMC neurology **13**(1): 1.
- Lacolley, P., et al. (1998). "Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects." Journal of hypertension **16**(1): 31-35.
- Lander, E. S., et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**(6822): 860-921.
- Lee, Y. H., et al. (2015). "Association between the CTLA-4, CD226, FAS polymorphisms and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis." Human immunology **76**(2): 83-89.
- Lee, Y. H., et al. (2014). "CTLA-4 polymorphisms and susceptibility to inflammatory bowel disease: a meta-analysis." Human immunology **75**(5): 414-421.
- Li, Y.-y., et al. (2016). "CTLA-4+ 49A/G gene polymorphism and type 1 diabetes mellitus in the Chinese population: a meta-analysis of 2238 subjects." International Journal of Diabetes in Developing Countries **36**(1): 45-51.
- Lindgren, A. and J. Maguire (2016). "Stroke Recovery Genetics." Stroke **47**(9): 2427-2434.
- Liu, J. and H.-X. Zhang (2013). "CTLA-4 polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a comprehensive meta-analysis." Genetic testing and molecular biomarkers **17**(3): 226-231.
- Liu, J. and H. Zhang (2013). "- 1722T/C polymorphism (rs733618) of CTLA-4 significantly associated with systemic lupus erythematosus (SLE): A comprehensive meta-analysis." Human immunology **74**(3): 341-347.
- Liu, R., et al. (2014). "Association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (T-786C) and ischemic stroke susceptibility: a meta-analysis." International Journal of Neuroscience **124**(9): 642-651.
- Lopes, J. M., et al. (2016). "Hospitalization for ischemic stroke in Brazil: an ecological study on the possible impact of Hiperdia." Revista Brasileira de Epidemiologia **19**(1): 122-134.
- Loterio, F. A. (2015). "Análise do padrão de ativação muscular de indivíduos hemiparéticos pós-AVC em marcha assistida por andador robótico."
- LOURENÇO, S., et al. (2013). "Modelo experimental estável de aneurisma sacular em artéria carótida de suínos utilizando veia jugular interna." Cirurgiões **40**(2): 130-136.
- Lozano, V. F., et al. (2011). "Polymorphism analysis of the CTLA-4 gene in paracoccidioidomycosis patients." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **106**(2): 220-226.
- Lu, Y., et al. (2014). "Quantitative assessment of CYP2D6 polymorphisms and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis." Journal of the neurological sciences **343**(1): 15-22.

- Magistris, F., et al. (2013). "Intracerebral hemorrhage: pathophysiology, diagnosis and management." MUMJ **10**(1): 15-22.
- Malta, D. C., et al. (2016). "Avanços do Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas não Transmissíveis no Brasil, 2011-2015." Epidemiologia e Serviços de Saúde **25**(2): 373-390.
- Marques, F. M. L. A. and R. M. L. Martins (2012). Independência funcional do doente pós AVC, Instituto Politécnico de Viseu, Escola Superior de Saúde de Viseu.
- Medeiros, C. S. P. d., et al. (2014). "Effects of mirror therapy through functional activities and motor standards in motor function of the upper limb after stroke." Fisioterapia e Pesquisa **21**(3): 264-270.
- Migliori, I. K. (2010). Uso de RNA de interferência (siRNA) para modulação da expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 em células dendríticas, Universidade de São Paulo.
- Minelli, C., et al. (2007). "Stroke Incidence, Prognosis, 30-Day, and 1-Year Case Fatality Rates in Matão, Brazil A Population-Based Prospective Study." Stroke **38**(11): 2906-2911.
- Mirrahimi, A., et al. (2014). "The role of glycemic index and glycemic load in cardiovascular disease and its risk factors: a review of the recent literature." Current atherosclerosis reports **16**(1): 1-10.
- Miyamoto, Y., et al. (1998). "Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension." hypertension **32**(1): 3-8.
- Montaner, J., et al. (2012). "Differentiating ischemic from hemorrhagic stroke using plasma biomarkers: the S100B/RAGE pathway." Journal of proteomics **75**(15): 4758-4765.
- Monteiro, P. C., et al. (2005). "Características biossociais, hábitos de vida e controle da pressão arterial dos pacientes em um programa de hipertensão." Arq Ciênc Saúde **12**(2): 73-79.
- Mota, D. V. N., et al. (2016). "Mirror therapy for upper limb rehabilitation in chronic patients after stroke." Fisioterapia em Movimento **29**(2): 287-293.
- Nakayama, M., et al. (1999). "T-786→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm." Circulation **99**(22): 2864-2870.
- Narooie-Nejad, M., et al. (2017). "Association of CTLA-4 gene polymorphisms-318C/T and +49A/G and Hashimoto's thyroiditis in Zahedan, Iran." Biomedical Reports **6**(1): 108-112.
- Nepomnyashchikh, D., et al. (2012). "Cytochrome P450 2D6 Polymorphism Is a Molecular Genetic Marker of Liver Cirrhosis Progression." Bulletin of experimental biology and medicine **152**(5): 633.
- Niu, P. P., et al. (2013). "Relationship between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and ischemic stroke: a meta-analysis." Acta Neurologica Scandinavica **128**(3): 202-212.
- Nyíró, G., et al. (2012). "The effect of the CYP 2C19*2 polymorphism on stroke care." Acta Physiologica Hungarica **99**(1): 33-39.
- O'Keefe, J. H., et al. (2014). Alcohol and cardiovascular health: the dose makes the poison... or the remedy. Mayo Clinic Proceedings, Elsevier.

Oselka, G. and E. J. Troster (2000). "Aspectos éticos do atendimento médico do adolescente." Revista da Associação Médica Brasileira **46**(4): 306-307.

Ota, T., et al. (2014). "Long PCR-based Genotyping for a Deleted CYP2D6 Gene without DNA Extraction." Drug metabolism and pharmacokinetics **29**(3): 283-285.

Owolabi, M. and A. Agunloye (2013). "Risk factors for stroke among patients with hypertension: A case-control study." Journal of the neurological sciences **325**(1): 51-56.

Passos, V., et al. (2016). "Consistent declining trends in stroke mortality in Brazil: mission accomplished?" Arquivos de neuro-psiquiatria **74**(5): 376-381.

Pawlowski, J., et al. (2013). "Avaliação neuropsicológica breve de adultos pós-acidente vascular cerebral em hemisfério esquerdo." Avances en Psicología Latinoamericana **31**(1): 33-45.

Pellerin, C., et al. (2016). "A Simple Variable Number of Tandem Repeat-Based Genotyping Strategy for the Detection of Handling Errors and Validation of Sample Identity in Biobanks." Biopreservation and Biobanking.

Pereira, A. B. C. N. d., et al. (2009). "Prevalência de acidente vascular cerebral em idosos no Município de Vassouras, Rio de Janeiro, Brasil, através do rastreamento de dados do Programa Saúde da Família." Cad. saúde pública **25**(9): 1929-1936.

Pereira, B. J. A. (2013). "Impacto da introdução do microdoppler vascular para a avaliação do fluxo sanguíneo cerebral durante a microcirurgia de aneurismas intracranianos."

Peter, J. and A. H. Justus (2016). "Knowledge and Practices of Stroke Survivors Regarding Secondary Stroke Prevention, Khomas Region, Namibia." Journal of Medical Biomedical and Applied Sciences **3**(1).

Peters, S. A., et al. (2013). "Smoking as a risk factor for stroke in women compared with men A systematic review and meta-analysis of 81 cohorts, including 3 980 359 individuals and 42 401 strokes." Stroke **44**(10): 2821-2828.

Petro, T. M., et al. (1999). "Smokeless tobacco and nicotine bring about excessive cytokine responses of murine memory T-cells." International journal of immunopharmacology **21**(2): 103-114.

Pinto, M. H. and M. M. F. Zago (2000). "A compreensão do significado cultural do aneurisma cerebral e do tratamento atribuídos pelo paciente e familiares: um estudo etnográfico." Revista Latino-Americana de Enfermagem **8**(1): 51-56.

Ponce, F. A. and A. M. Lozano (2010). "Highly cited works in neurosurgery. part ii: the citation classics: A review." Journal of neurosurgery **112**(2): 233-246.

Radanovic, M. (2000). "Características do atendimento de pacientes com acidente vascular cerebral em hospital secundário." Arq Neuropsiquiatr **58**(1): 99-106.

Rangel, E. S. S., et al. (2013). "Qualidade de vida de pacientes com acidente vascular cerebral em reabilitação." Acta paul enferm **26**(2): 205-212.

Reith, F. C., et al. (2016). "Lack of Standardization in the Use of the Glasgow Coma Scale: Results of International Surveys." Journal of neurotrauma **33**(1): 89-94.

Robinson, S. R., et al. (2013). "Hemin toxicity: a preventable source of brain damage following hemorrhagic stroke." Redox Report.

Rodrigues, E. S. R., et al. (2013). "Fatores de risco cardiovascular em pacientes com acidente vascular cerebral." AMAZÔNIA: SCIENCE & HEALTH **1**(2): 21-28.

Rodrigues, E. S. R., et al. (2016). "Fatores de risco para doenças ateroscleróticas cardiovasculares em escolares: uma ação preventiva primária. Relato de experiência." AMAZÔNIA: SCIENCE & HEALTH **4**(2): 16-26.

Rolindo, S. J. S. and L. T. Oliveira (2016). "ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO: REVISÃO SISTEMÁTICA DOS ASPECTOS ATUAIS DO TRATAMENTO NA FASE AGUDA." Revista de Patologia do Tocantins **3**(3): 18-26.

Rudd, C. E. (2008). "The reverse stop-signal model for CTLA4 function." Nature Reviews Immunology **8**(2): 153-160.

Sajib, A., et al. (2016). "Phylogenetic analysis of Bangladeshi population with reference to D1S80 VNTR locus." Biores Comm **2**(1): 146-151.

Salazar Pelaéz, L. M., et al. (2012). "Polimorfismos genéticos da interleucina-1 e o risco de periodontite periapical crônica numa população de Antioquia, Colômbia."

Saleh, H. M., et al. (2013). "Association of CTLA-4 Polymorphisms with Type 1 Diabetes in the Egyptian Population." Journal of Diabetes & Metabolism **2013**.

Salimi, S., et al. (2008). "Lack of evidence for contribution of intron4a/b polymorphism of endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene to plasma nitric oxide levels." Acta cardiologica **63**(2): 229.

Salimi, S., et al. (2012). "Association of plasma nitric oxide concentration and endothelial nitric oxide synthase T-786C gene polymorphism in coronary artery disease." Pathophysiology **19**(3): 157-162.

Sandrim, V. C. and J. E. Tanus-Santos (2008). "O conhecimento em farmacogenômica pode auxiliar no controle da pressão arterial em pacientes com hipertensão de difícil controle." Revista brasileira de hipertensão **15**(1): 34-36.

SCHINCARIOL, L. P. (2011). "Identificação de marcadores SNP pelas técnicas de PCR-RFLP e Tetra-primer ARMS-PCR e suas associações com qualidade de bebida em café." Instituto agrônomo curso de pós-graduação em agricultura tropical e subtropical.

Silva, D. C. S., et al. (2013). "Efeitos da Mobilização Precoce nas Complicações Clínicas Pós-AVC: Revisão da Literatura." Rev. Neurociencia **21**(4): 620-627.

Silva, I. F. G. d., et al. (2016). "Viver e Cuidar Após o Acidente Vascular Cerebral." Revista de Enfermagem Referência(8): 103-111.

Silva, M. V. d. (2013). "Aspectos clínicos e epidemiológicos dos casos de acidente vascular encefálico hemorrágico intraparenquimatoso: perfil epidemiológico em uma série monocêntrica no Distrito Federal."

- Sinici, I., et al. (2010). "Endothelial nitric oxide gene polymorphism and risk of systemic sclerosis: predisposition effect of T-786C promoter and protective effect of 27 bp repeats in Intron 4." Clinical & Experimental Rheumatology **28**(2): 169.
- Somarajan, B., et al. (2011). "Evaluation of MTHFR C677T polymorphism in ischemic and hemorrhagic stroke patients. A case-control study in a Northern Indian population." Journal of the neurological sciences **304**(1): 67-70.
- Sponton, C. G., et al. (2014). "The presence of the NOS3 gene polymorphism for intron 4 mitigates the beneficial effects of exercise training on ambulatory blood pressure monitoring in adults." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology: ajpheart. 00844.02013.
- Staalsø, J. M., et al. (2014). "Association of the NOS3 intron-4 VNTR polymorphism with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: clinical article." Journal of neurosurgery **121**(3): 587-592.
- Starke, R. M., et al. (2014). "Vascular smooth muscle cells in cerebral aneurysm pathogenesis." Translational stroke research **5**(3): 338-346.
- Strbian, D., et al. (2012). "Symptomatic intracranial hemorrhage after stroke thrombolysis: the SEDAN score." Annals of neurology **71**(5): 634-641.
- Sundseth, A., et al. (2014). "Factors related to knowledge of stroke symptoms and risk factors in a Norwegian stroke population." Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases **23**(7): 1849-1855.
- Suzano, D. S., et al. (2016). "A IMPORTÂNCIA DA QUALIDADE DE VIDA EM PACIENTES HIPERTENSOS." Saúde em Redes **2**(1): 53-63.
- Tada, H., et al. (2014). "Twelve-Single Nucleotide Polymorphism Genetic Risk Score Identifies Individuals at Increased Risk for Future Atrial Fibrillation and Stroke." Stroke **45**(10): 2856-2862.
- Tao, H.-m. and G.-z. Chen (2009). "Endothelial NO synthase gene polymorphisms and risk of ischemic stroke: a meta-analysis." Neuroscience research **64**(3): 311-316.
- Taylor, A., et al. (2016). "Advances in stroke treatment are within reach." South African Medical Journal **106**(5): 454-455.
- Teasdale, G. and B. Jennett (1974). "Assessment of coma and impaired consciousness: a practical scale." The Lancet **304**(7872): 81-84.
- Teasdale, G., et al. (2014). "The Glasgow Coma Scale at 40 years: standing the test of time." The Lancet Neurology **13**(8): 844-854.
- Teles, P. d. B. (2013). "Polimorfismo genético da apolipoproteína E e avaliação sociodemográfica em pacientes com periodontite crônica."
- Tempfer, C. B., et al. (2001). "An endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with preeclampsia." Hypertension in pregnancy **20**(1): 107-118.
- Ting, W.-H., et al. (2016). "Association of Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA4) Gene Polymorphisms with Autoimmune Thyroid Disease in Children and Adults: Case-Control Study." PLoS one **11**(4): e0154394.

Trialists' Collaboration, S. U. (2013). "Organised inpatient (stroke unit) care for stroke." Cochrane Database Syst Rev **9**.

Türkanoğlu Özçelik, A., et al. (2014). "Importance of NOS3 Genetic Polymorphisms in the Risk of Development of Ischemic Stroke in the Turkish Population." Genetic testing and molecular biomarkers **18**(12): 797-803.

Villela, P. B., et al. (2016). "Evolução da Mortalidade por Doenças Cerebrovasculares e Hipertensivas no Brasil entre 1980 e 2012." hypertension **107**(1): 26-32.

Wanderley Filho, L. E. R., et al. (2013). "ANEURISMA DO SEGMENTO P3 DA ARTÉRIA CEREBRAL POSTERIOR NA INFÂNCIA." Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria **17**(2).

Wang, J., et al. (2014). "Sex differences in trends of incidence and mortality of first-ever stroke in rural Tianjin, China, from 1992 to 2012." Stroke **45**(6): 1626-1631.

Wang, J. J., et al. (2009). "The association of CTLA-4 and CD28 gene polymorphisms with idiopathic ischemic stroke in the paediatric population." International journal of immunogenetics **36**(2): 113-118.

Wang, L., et al. (2015). "Associations between CTLA-4+ 49 A/G (rs231775) polymorphism and cancer risk: a meta-analysis based on 52 case-control studies." International journal of clinical and experimental medicine **8**(5): 6835.

Weih, M., et al. (1999). "Attenuated Stroke Severity After Prodromal TIA A Role for Ischemic Tolerance in the Brain?" Stroke **30**(9): 1851-1854.

Weiss, J., et al. (2012). "No difference in genotype frequencies of polymorphisms of the nitric oxide pathway between Caucasian normal and high tension glaucoma patients."

Wu, Z., et al. (2013). "A systematically combined genotype and functional combination analysis of CYP2E1, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 in different geographic areas of mainland China—a basis for personalized therapy." PloS one **8**(10): e71934.

Yasukochi, Y. and Y. Satta (2015). "Molecular evolution of the CYP2D subfamily in primates: Purifying selection on substrate recognition sites without the frequent or long-tract gene conversion." Genome biology and evolution **7**(4): 1053-1067.

Zalata, A., et al. (2015). "Cytochrome P450-2D6* 4 polymorphism seminal relationship in infertile men." Andrologia **47**(5): 525-530.

Zaletel, K., et al. (2006). "Thyroid autoantibody production is influenced by exon 1 and promoter CTLA-4 polymorphisms in patients with Hashimoto's thyroiditis." International journal of immunogenetics **33**(2): 87-91.

Zhang, Q., et al. (2013). "Ideal cardiovascular health metrics and the risks of ischemic and intracerebral hemorrhagic stroke." Stroke **44**(9): 2451-2456.

Zhao, H.-Y., et al. (2014). "Meta-analysis of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene+ 6230G/A polymorphism and cancer risk." Clinical and Translational Oncology **16**(10): 879-885.

Zhao, S., et al. (2012). "Nitric oxide synthase 3 (NOS3) 4b/a, T-786C and G894T polymorphisms in association with diabetic retinopathy susceptibility: a meta-analysis." Ophthalmic genetics **33**(4): 200-207.

Zis, P., et al. (2013). "Ambulatory blood pressure monitoring in acute stroke: pathophysiology of the time rate of blood pressure variation and association with the 1-year outcome." Blood pressure monitoring **18**(2): 94-100.

Zordoky, B. N. and A. O. El-Kadi (2010). "Effect of cytochrome P450 polymorphism on arachidonic acid metabolism and their impact on cardiovascular diseases." Pharmacology & therapeutics **125**(3): 446-463.

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa/SES-DF.

GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/SES-DF

PARECER Nº 0095/2010

PROTOCOLO Nº DO PROJETO: 380/2010 – POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO HEMORRÁGICO E AO ANEURISMA INTRACEREBRAL.

Instituição Pesquisada: Secretaria de Saúde do Distrito Federal/SES-DF.

Área Temática Especial: Grupo III (não pertencente à área temática especial), Ciências da Saúde.

Validade do Parecer: 15/12/2012

Tendo como base a Resolução 196/96 CNS/MS, que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras em pesquisa envolvendo seres humanos, assim como as suas resoluções complementares, o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, após apreciação ética, manifesta-se pela **APROVAÇÃO DO PROJETO**.

Esclarecemos que o pesquisador deverá observar as responsabilidades que lhe são atribuídas na Resolução 196/96 CNS/MS, inciso IX.1 e IX.2, em relação ao desenvolvimento do projeto. **Ressaltamos a necessidade de encaminhar o relatório parcial e final, além de notificações de eventos adversos quando pertinentes.**

Brasília, 16 de dezembro de 2010.

Atenciosamente,

Maria Rita Carvalho Garbi Novaes
Comitê de Ética em Pesquisa/SES-DF
Coordenadora

AL/CEP/SES-DF

Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde - SES
Comitê de Ética em Pesquisa
Fone: 325-4955 - Fone/Fax: 326-0119 - e-mail: cepesdf@saude.df.gov.br
SMHN - Q. 501 - Bloco "A" - Brasília - DF - CEP.: 70.710-907

BRASÍLIA - PATRIMÔNIO CULTURAL DA HUMANIDADE

ANEXO B – Ficha de identificação dos participantes da pesquisa.

Nome do participante: _____

Nome do representante legal (se houver): _____

Idade: _____

Sexo: ☐ Masc. ☐ Fem.

Cor: _____

Estado Civil: _____

Data do acidente vascular encefálico hemorrágico e/ou do aneurisma
intracerebral: _____Hipertensão arterial: ☐ Sim ☐ Não

Pressão Arterial: _____

Diabetes: ☐ Sim ☐ Não

Glicemia: _____

Tabagismo: ☐ Sim ☐ Não Se sim, quantos maços por dia: _____Etilismo: ☐ Sim ☐ Não Se sim, quanto por dia: _____

Uréia: _____

Creatinina: _____

Plaquetas: _____

Escala de Glasgow: _____

Escala de Rankin: _____

Índice de Barthel: _____

Tomografia: _____

Angiografia: _____

Observações: _____

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Paciente

Polimorfismos genéticos associados ao Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico e ao Aneurisma Intracerebral

Este documento que você está lendo é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Ele contém explicações sobre o estudo que você está sendo convidado a participar. Antes de decidir se deseja participar (de livre e espontânea vontade) você deverá ler e compreender todo o conteúdo. Ao final, caso decida participar, você será solicitado a assiná-lo e receberá uma cópia do mesmo. Antes de assinar faça perguntas sobre tudo o que não tiver entendido bem. A equipe deste estudo responderá às suas perguntas a qualquer momento (antes, durante e após o estudo).

Natureza e objetivos do estudo:

Você está sendo convidado a participar de um estudo pelo fato de ter apresentado um aneurisma ou um acidente vascular encefálico (“derrame”). Você poderá decidir participar ou não. A decisão é sua.

Existe uma possibilidade de associação de fatores genéticos com o aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”), assim, este estudo tem o objetivo geral de conhecer um pouco melhor como “funciona” estas doenças, do ponto de vista genético.

O objetivo específico deste estudo é o de conhecer se determinadas seqüências do DNA (material genético que informa como nosso corpo é formado) pode aumentar o risco de pessoas apresentarem aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”).

Procedimentos do estudo:

Sua participação consiste em responder um questionário e autorizar que seu os pesquisadores possam ver seu prontuário, para que tenham maior conhecimento de seus exames, tratamento e da história da sua doença.

Após isso será coletado de você, uma única vez, aproximadamente 10 ml (uma seringa pequena) de sangue, através de uma punção da veia do seu antebraço. O procedimento é o mesmo utilizado para realização de diversos outros tipos de exame de sangue. Serão utilizados equipamentos novos, estéreis e descartáveis.

Não haverá nenhuma outra forma de envolvimento ou comprometimento neste estudo.

Riscos:

Este estudo possui riscos mínimos que são inerentes do procedimento de coleta de sangue. Medidas preventivas durante a coleta serão tomadas para minimizar qualquer risco ou incômodo.

Poderá haver pequeno incômodo de dor no momento da introdução da agulha para a retirada do sangue e, eventualmente, a formação de um pequeno hematoma (mancha roxa) no local.

Benefícios:

A sua participação neste estudo poderá proporcionar, no âmbito pessoal, a identificação de algum problema não antes conhecido.

Os resultados estarão sempre disponíveis a você. Caso seja de seu desejo, os resultados serão discutidos com você pela equipe deste trabalho.

Sua participação poderá ainda ajudar no maior conhecimento sobre o aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”), principalmente em relação às causas genéticas da doença.

Participação, recusa e direito de se retirar do estudo:

Sua participação é voluntária e não alterará o seguimento e tratamento da doença que você já está fazendo.

Você poderá se retirar desta pesquisa a qualquer momento, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis.

Caso você decida não participar, isto não afetará o seguimento e tratamento normal nem o seu relacionamento com seu médico.

Conforme previsto pelas leis brasileiras você não receberá nenhum tipo de compensação financeira pela sua participação neste estudo.

Confidencialidade:

Os seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente.

Seus dados serão identificados com um número e somente os pesquisadores saberão que número pertence a cada indivíduo.

Os resultados de seus exames, bem como as informações de seu prontuário, serão acessíveis somente aos pesquisadores envolvidos.

O seu sangue, coletado no presente estudo, ficará guardado no Centro de Neurociências, no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, no banco de amostras “Aneurisma- AVE”, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Renata Mortari.

Toda nova pesquisa a ser feita com o material guardado será submetida para aprovação de um Comitê de Ética em Pesquisa e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, entretanto, ele mostrará apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição a qual pertence ou qualquer informação que esteja relacionada com sua privacidade.

Se o Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor entre em contato com a enfermeira Hélia Carla de Souza, no setor de Neurocirurgia, do Hospital de Base de Brasília, no horário matutino. Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da SES/DF. Qualquer dúvida com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3325-4955. Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

Eu, _____ RG _____, após receber uma explicação completa dos objetivos do estudo e dos procedimentos envolvidos concordo voluntariamente em fazer parte deste estudo.

Brasília, _____ de _____ de _____

Participante

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Representante Legal

Polimorfismos genéticos associados ao Acidente Vascular Encefálico Hemorrágico e ao Aneurisma Intracerebral

Este documento que você está lendo é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Ele contém explicações sobre o estudo que o paciente sob sua responsabilidade está sendo convidado a participar. Antes de decidir se deseja aceitar que o paciente sob sua responsabilidade (de livre e espontânea vontade) participe, você deverá ler e compreender todo o conteúdo. Ao final, caso decida aprovar a participação, você será solicitado a assiná-lo e receberá uma cópia do mesmo. Antes de assinar faça perguntas sobre tudo o que não tiver entendido bem. A equipe deste estudo responderá às suas perguntas a qualquer momento (antes, durante e após o estudo).

Natureza e objetivos do estudo:

O paciente sob a sua responsabilidade está sendo convidado a participar de um estudo pelo fato de ter apresentado um aneurisma ou um acidente vascular encefálico (“derrame”). Você poderá decidir que ele participe ou não. A decisão é sua.

Existe uma possibilidade de associação de fatores genéticos com o aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”), assim, este estudo tem o objetivo geral de conhecer um pouco melhor como “funciona” estas doenças, do ponto de vista genético.

O objetivo específico deste estudo é o de conhecer se determinadas seqüências do DNA (material genético que informa como nosso corpo é formado) pode aumentar o risco de pessoas apresentarem aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”).

Procedimentos do estudo:

A participação do paciente sob sua responsabilidade consiste em autorizar que seu os pesquisadores possam ver o prontuário do paciente, para que tenham maior conhecimento dos exames, tratamento e da história da sua doença do paciente que está sob sua responsabilidade.

Após isso será coletado do paciente sob sua responsabilidade, uma única vez, aproximadamente 10 ml (uma seringa pequena) de sangue, através de uma punção da veia do seu antebraço. O procedimento é o mesmo utilizado para realização de diversos outros tipos de exame de sangue. Serão utilizados equipamentos novos, estéreis e descartáveis.

Não haverá nenhuma outra forma de envolvimento ou comprometimento neste estudo.

Riscos:

Este estudo possui riscos mínimos que são inerentes do procedimento de coleta de sangue. Medidas preventivas durante a coleta serão tomadas para minimizar qualquer risco ou incômodo.

Poderá haver pequeno incômodo de dor no momento da introdução da agulha para a retirada do sangue e, eventualmente, a formação de um pequeno hematoma (mancha roxa) no local.

Benefícios:

A participação do paciente sob sua responsabilidade poderá proporcionar, no âmbito pessoal, a identificação de algum problema não antes conhecido.

Os resultados estarão sempre disponíveis a você. Caso seja de seu desejo, os resultados serão discutidos com você pela equipe deste trabalho.

A participação do paciente sob sua responsabilidade poderá ainda ajudar no maior conhecimento sobre o aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”), principalmente em relação às causas genéticas da doença.

Participação, recusa e direito de se retirar do estudo :

A participação do paciente sob sua responsabilidade é voluntária e não alterará o seguimento e tratamento da doença que você já está fazendo.

Você poderá retirar a autorização de participação do paciente sob sua responsabilidade desta pesquisa a qualquer momento, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis.

Caso você decida não concordar com a participação, isto não afetará o seguimento e tratamento normal nem o relacionamento do paciente sob sua responsabilidade com a equipe médica.

Conforme previsto pelas leis brasileiras você não haverá nenhum tipo de compensação financeira pela participação neste estudo.

Confidencialidade:

Os registros médicos serão sempre tratados confidencialmente.

Os dados do paciente sob sua responsabilidade serão identificados com um número e somente os pesquisadores saberão que número pertence a cada indivíduo.

Os resultados dos exames, bem como as informações do prontuário, serão acessíveis somente aos pesquisadores envolvidos.

O sangue do paciente sob sua responsabilidade, coletado no presente estudo, ficará guardado no Centro de Neurociências, no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, no banco de amostras “Aneurisma-AVE”, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Renata Mortari. Toda nova pesquisa a ser feita com o material guardado será submetida para aprovação de um Comitê de Ética em Pesquisa e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, entretanto, ele mostrará apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição a qual pertence ou qualquer informação que esteja relacionada com sua privacidade.

Se o Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor entre em contato com a enfermeira Hélia Carla de Souza, no setor de Neurocirurgia, do Hospital de Base de Brasília, no horário matutino. Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da SES/DF. Qualquer dúvida com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3325-4955. Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

Eu, _____ RG _____, após receber uma explicação completa dos objetivos do estudo e dos procedimentos envolvidos concordo voluntariamente em permitir a participação do _____ paciente sob _____ minha _____ responsabilidade, _____ o Sr(a) _____ Brasília, _____ de _____ de _____

Responsável pelo Participante da pesquisa

ANEXO D – Termo de guarda de material biológico de todos os participantes da pesquisa.

Termo de Guarda de Material Biológico – Indivíduos “saudáveis”

Este documento é chamado é chamado Termo de Guarda de Material Biológico. Ele contém explicações sobre a guarda de seu material biológico (sangue). Você poderá autorizar ou não a guarda de seu material biológico. A decisão é sua.

O seu sangue, coletado no presente estudo, ficará guardado no Centro de Bioprospecção e Neurociências, no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, no banco de amostras “Aneurisma-AVE”, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Renata Mortari e será utilizado somente para verificar os polimorfismos genéticos do presente estudo.

As amostras de sangue serão identificadas com um número e não com seu nome. Somente os pesquisadores saberão a quem pertence cada número, mantendo-se assim o sigilo e respeito à confidencialidade dos seus dados.

Se for de seu interesse, você terá acesso aos resultados dos seus exames.

O sangue será utilizado somente em pesquisas que tenham como objetivos verificar a frequência de determinadas sequências no DNA (material genético que informa como nosso corpo é formado) em indivíduos saudáveis.

Os trabalhos resultantes destas pesquisas mostrarão apenas os resultados e nunca seu nome ou qualquer outra informação que ponha em risco sua privacidade.

Todas as informações estarão sempre à sua disposição, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores.

A qualquer momento você terá acesso a seus dados genéticos, assim como terá o direito de retirar seu material biológico do banco onde se encontra armazenado.

Toda nova pesquisa a ser feita com o material guardado será submetida para aprovação do CEP da instituição e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

Eu, _____ RG _____, após receber uma explicação completa dos procedimentos envolvidos na guarda de material biológico, venho através deste termo consentir a guarda de meu material biológico (sangue) decorrente da presente pesquisa.

Assinatura do participante
Brasília, _____ de _____ de _____

Termo de Guarda de Material Biológico – Paciente

Este documento é chamado é chamado Termo de Guarda de Material Biológico. Ele contém explicações sobre a guarda de seu material biológico (sangue). Você poderá autorizar ou não a guarda de seu material biológico. A decisão é sua.

O seu sangue, coletado no presente estudo, ficará guardado no Centro de Bioprospecção e Neurociências, no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, no banco de amostras “Aneurisma-AVE”, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Renata Mortari. - O sangue será utilizado somente em pesquisas que tenham como objetivos verificar se determinadas sequências no DNA (material genético que informa como nosso corpo é formado) pode aumentar o risco de pessoas apresentarem aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”).

As amostras de sangue serão identificadas com um número e não com seu nome. Somente os pesquisadores saberão a quem pertence cada número. Os trabalhos resultantes destas pesquisas mostrarão apenas os resultados e nunca seu nome ou qualquer outra informação que ponha em risco sua privacidade.

Todas as informações estarão sempre à sua disposição, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores.

A qualquer momento você terá acesso a seus dados genéticos, assim como terá o direito de retirar seu material biológico do banco onde se encontra armazenado.

Toda nova pesquisa a ser feita com o material guardado será submetida para aprovação do CEP da instituição e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

Eu, _____ RG _____, após receber uma explicação completa dos procedimentos envolvidos na guarda de material biológico, venho através deste termo consentir a guarda de meu material biológico (sangue) decorrente da presente pesquisa.

Assinatura do participante
Brasília, _____ de _____ de _____

Termo de Guarda de Material Biológico – Representante Legal

Este documento é chamado Termo de Guarda de Material Biológico. Ele contém explicações sobre a guarda do material biológico (sangue) do paciente sob sua responsabilidade. Você poderá autorizar ou não a guarda do material biológico do paciente sob sua responsabilidade.

Toda nova pesquisa a ser feita com o material guardado será submetida para aprovação do CEP da instituição e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

A qualquer momento você terá acesso aos dados do paciente sob sua responsabilidade e de seus dados genéticos, assim como terá o direito de retirar o material biológico do banco onde se encontra armazenado.

Todas as informações estarão sempre à sua disposição, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores.

Os trabalhos resultantes destas pesquisas mostrarão apenas os resultados e nunca o nome do paciente ou qualquer outra informação que ponha em risco sua privacidade.

As amostras de sangue serão identificadas com um número e não com o nome do paciente sob sua responsabilidade. Somente os pesquisadores saberão a quem pertence cada número.

O sangue será utilizado somente em pesquisas que tenham como objetivos verificar se determinadas sequências no DNA (material genético que informa como nosso corpo é formado) pode aumentar o risco de pessoas apresentarem aneurisma ou acidente vascular encefálico (“derrame”).

O sangue do paciente sob sua responsabilidade, coletado no presente estudo, ficará guardado no Centro de Bioprospecção e Neurociências, no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, no banco de amostras “Aneurisma-AVE”, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Renata Mortari.

Eu, _____ RG _____, após receber uma explicação completa dos procedimentos envolvidos na guarda de material biológico, venho através deste termo consentir a guarda do material biológico (sangue) do paciente sob minha responsabilidade. Paciente sob minha responsabilidade:

Assinatura do participante
Brasília, _____ de _____ de _____

ANEXO E – Anais de Congressos

Anais do Congresso Brasileiro Internacional de Genética – Brazilian-International Congress of Genetics – 2016



Resumos do GENÉTICA 2016 – 62º Congresso Brasileiro de Genética – 11 a 14 de setembro de 2016
Hotel Glória - Caxambu - MG - Brasil
www.sbg.org.br - ISBN 978-85-89109-06-2



CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4) -318 C/T polymorphism in Brazilian cases with hemorrhagic stroke

Cardoso, LCA¹; Peretia, IS¹; Ferreira, LB²; Freire, DO³; Kogawa, EM⁴; Siqueira, LBN⁵; Silva, ICR⁶.

¹Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília – UnB, Brasília, Brazil; ²Centro Universitário de Brasília (Uniceub); ³Faculdade LS, Brasília, Brazil; ⁴Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil; ⁵Curso de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; ⁶Faculdade de Celândia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil.

ilgia.canongia@gmail.com

Palavra-chave: Keywords: Polymorphism genetic, CTLA4, hemorrhagic stroke, cytokines, aneurism.

Hemorrhagic stroke (HS) is one of the leading causes of mortality around the world and is an important health problem. It is a multi-factorial disease resulting from combination of environmental and genetic factors. The World Health Organization (WHO) reports that stroke has accounted for 15 million cases worldwide every year, of these more than 5 million die and another 5 million are permanently disabled. Most of these deaths are usually in developed countries. Pro-inflammatory cytokines are associated with stroke and functional polymorphisms of inflammatory genes may influence the incidence and outcome of others types of stroke. For individualized treatment and screening susceptible populations at risk of hemorrhagic stroke, it is important to find the genes involved at occurrence. In this study, we examined the Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA4) gene polymorphism. CTLA-4 is one of the most important immunosuppressive cytokines that inhibits T-cell activation and terminates the T-cell response by blocking signals stimulates via CD28. CTLA4 is located on chromosome 2q33 in humans and encodes cell surface molecules that play a dominant role in the regulation of T-cell activation. The aim of this study was to verify in a Brazilian population the association between CTLA4 (-318 C/T, rs5742909) gene polymorphism in the promoter region and the risk of developing stroke. There have been no previous studies examining this gene in the Brazilian population with HS. An PCR-RFLP was designed for screening the allele C and T of SNP rs5742909 in a Federal District (Brazil) sample with 126 HS or aneurism patients and 39 healthy persons paired by gender and age. After the calculation of allele and genotypic frequencies of each group were used statistical tests appropriate for each type of comparison. The heterozygous genotype CT was more prevalent on case group than the control group (34.1% and 15.4%, respectively) demonstrating a significant difference in frequencies between the groups ($P = 0.025$). *Odds ratio* indicate that the presence of genotype CT is a risk factor for HS/aneurism (OR: 2.849; CI: 1.11-7.32). Statistics differences were also observed in the clinical characteristics such as the diabetes presence ($P = 0.015$). In summary, this study demonstrated that presence of genotype CT at position -318 of the CTLA4 gene is a risk factor for HS/aneurism on Brazilians. In view of the complexity of the process to causes HS, we cannot exclude the possibility that polymorphisms in other genes can be also responsible for risk factors for HS.

Fonte de financiamento: Financial Support: Research supported by the University LS, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq with support from Universidade de Brasília – UnB and Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal – FAP-DF.

Anais do Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2016



284. ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE (ENOS/NOS3) INTRON 4 POLYMORPHISM IN CASES OF ANEURYSM AND HEMORRHAGIC STROKE IN BRAZIL

Cardoso LCA^a, Borges FSA^a, Pereira IS^a, Kogawa EM^b, Ferreira LB^c, Freire DO^d, Silva ICR^a

^a Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil

^b Universidade Católica de Brasília (UCB), Brasília, DF, Brazil

^c Centro Universitário de Brasília (UniCEUB), Brasília, DF, Brazil

^d Faculdade LS, Brasília, DF, Brazil

Objectives: The aim of this study was to verify, in a Brazilian population, the association between NOS3 intron 4 gene polymorphism and the risk of developing hemorrhagic stroke (HS) or intracranial aneurysm.

Materials and methods: The study included 92 cases, 39 with aneurysm and 53 with HS, and 92 healthy controls. For the final formation of the groups, the controls were age- and sex-paired to cases. NOS3 4a/b polymorphism was detected by PCR flanking the 27 bp repeat in intron 4 of the gene. The PCR products were electrophoresed on a 3% agarose gel. In the presence of eNOS a allele, a fragment with 393 bp was produced, while the eNOS b allele produced a fragment with 420 bp. An informed consent was obtained for each participant, and the study was approved by the Ethical Committee of FEPECS-DF. Demographic and clinical characteristics were compared by using the chi-squared and Fisher exact tests according to the presence of each eNOS 4a/b genotype. The significance level adopted was 5% ($p < 0.05$). All data analysis was performed in SPSS 22.0. **Results:** The frequency of minor allele of eNOS was higher in the case group (24.5%) than in the control group (17.4%). However, the difference did not reach statistical significance ($p = 0.095$). Also, no significant difference was found between HS and aneurysm related to the controls regarding the distribution of eNOS 4a/b genotypes ($p = 0.255$). The presence of the b/b genotype was not associated with systemic arterial hypertension ($p = 0.877$) or diabetes ($p = 0.369$) in the case group. Furthermore, the b/b genotype in case group was not related a good/poor prognosis based on the Rankin Scale ($p = 0.676$). **Discussion:** A Danish case-control study found that the b/b genotype of the intron-4 27-bp VNTR polymorphism was associated with aneurysmal subarachnoid hemorrhage and that the univariate association was driven by an interaction with sex: the b/b genotype was much more prevalent among male patients than among female patients. Conversely, the intron 4b/b genotype was shown as an important genetic risk factor for early-onset ischemic stroke in the Chinese population. On the contrary, according to some Chinese and Indian studies, the 4a allele was found to be a risk

factor for stroke. A Turkish study found no relevance between intron 4 VNTR polymorphism and ischemic stroke risk. However, there have been no previous studies examining this gene in the Brazilian population with aneurysm and hemorrhagic stroke (HS). **Conclusion:** The results indicate that the polymorphism NOS3 intron 4 is not a risk factor for predisposition of aneurysm and HS in Brazilian population.

276. IL6 -174 G/C POLYMORPHISM IS ASSOCIATED WITH PREDISPOSITION AND POOR PROGNOSIS OF HEMORRHAGIC STROKE AND INTRACEREBRAL ANEURYSM

Borges FSA^a, Campos DHM^a, Cardoso LCA^a, Nóbrega OT^a, Kogawa EM^b, Ferreira LB^c, Freire DO^d, Silva ICR^a

^a Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil

^b Universidade Católica de Brasília (UCB), Brasília, DF, Brazil

^c Centro Universitário de Brasília (UniCEUB), Brasília, DF, Brazil

^d Faculdade LS, Brasília, DF, Brazil

Objectives: The interleukin 6 (IL6) is a pro-inflammatory cytokine that plays an important role in inflammatory processes and the immune system, among others. Evidence has shown that processes may influence the development of cerebrovascular disease. Polymorphisms in the promoter region of the coding gene IL6 may modify the structure and influence the circulating levels of the cytokine. Therefore, a case-control study was performed to assess whether there is an association between the il6 -174 g/c (rs1800795) polymorphic variants and aneurysm and hemorrhagic stroke (HS) in a Brazilian population. **Materials and methods:** Peripheral venous blood samples were collected from 92 patients with aneurysm/HS (aneurysm, n = 39; HS, n = 53) and 92 healthy individuals as control, as well as clinical characteristics. The gene amplification technique through the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and cleavage with the restriction enzyme NlaIII was used to identify the IL6 genotypes. In order to describe the categorical variables according to the presence of GG genotype, the chi-squared and Fisher exact tests were used. The significance level adopted was 5% ($p < 0.05$). All data analysis were performed in SPSS 22.0 **Results:** It was observed that individuals with IL6 -174G/C (rs1800795) GG genotype present a higher risk of HS or aneurysm when compared with those carrying the wild-type genotype, CC, and GC+CC ($p = 0.024$; odds ratio = 1.99; 95% CI: 1.09 to 3.63), 70/92 cases (47.8%) and 29/63 controls (31.5%) with GG genotype. There were more GG genotype patients with systemic arterial hypertension than patients with GC+CC genotype ($p = 0.005$; OR = 4.15; 95% CI: 1.47 to 11.71) was observed. Furthermore, an association was observed between the presence of GG genotype in case group and poor prognosis based on the Rankin Scale ($p = 0.002$). **Discussion:** The G allele is associated with an increase of IL-6 production, contributing to an excessive inflammatory process. Some studies have evaluated the association between IL6 -174G/C (rs1800795) polymorphic variants and cardiovascular diseases in several populations. Some of these studies did not demonstrate an association; nonetheless, most of them found an increase risk of stroke and cardiovascular events, mostly with the GG genotype. **Conclusion:** The results indicate that the polymorphism IL6 -174G/C (rs1800795) might be a risk factor for predisposition of aneurysm and HS in Brazilian population; it is associated with poor prognosis in these pathologies.